



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale

BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA

**Espressione differenziale dei miRNA in cellule staminali umane
da liquido amniotico trattate con nicotina**

**Differential expression of miRNAs in human Amniotic Fluid Stem
Cells treated with nicotine**

Tesi di Laurea Magistrale
di: Daniela Gattone

Relatore
Chiar.mo Prof. Anna La Teana

Correlatore:
Prof. Liborio Stuppia

Sessione Autunnale

Anno Accademico 2018/2019

INDICE

Capitolo I-Introduzione	1
1.1. Il fumo: un quadro epidemiologico del problema	1
1.2. La nicotina ed il suo metabolismo	3
1.3. L'esposizione prenatale alla nicotina	5
1.4. Gli effetti dell'esposizione prenatale alla nicotina	6
1.5 Il ruolo dell'epigenetica	9
1.5.1. La metilazione del DNA	11
1.5.2. La metilazione dell'RNA	14
1.5.3. Le modifiche post-traduzionali degli istoni	16
1.5.4. La regolazione dell'RNA	19
1.6. L'effetto della nicotina sull'espressione dei miRNA	25
1.7. Le cellule staminali umane da liquido amniotico come modello cellulare	27
Capitolo II-Scopo della tesi	32
Capitolo III-Materiali e Metodi	35
3.1. Raccolta dei campioni e messa in coltura delle hAFSCs	35
3.2. Nicotina e MTS-Assay	36
3.3. Differenziamento adipogenico e colorazione Oil Red O	38
3.4. Estrazione degli acidi nucleici	39

3.4.1. Estrazione del DNA	40
3.4.2. Estrazione RNA totale e miRNA	41
3.5. Quantizzazione degli acidi nucleici	43
3.6. Retrotrascrizione e Real Time qPCR	44
3.7. Immunofenotipizzazione mediante citometria a flusso	46
3.8. Analisi dello stato di metilazione	48
3.8.1. Metilazione globale del DNA	48
3.8.2. Metilazione dell'RNA	49
3.9. Analisi del profilo di espressione dei miRNA mediante NGS	51
3.9.1. Preparazione delle librerie per "Small RNA"	51
3.9.2. Preparazione del template mediante Emulsion-PCR e caricamento sul Chip	55
3.9.3. Sequenziamento del Chip	57
3.9.4. Analisi dei dati di NGS	58
3.10. Analisi statistica	60
Capitolo IV-RISULTATI	61
4.1. Effetto della nicotina sulla proliferazione cellulare	61
4.2. Effetto della nicotina su cellule staminali non differenziate	61
4.2.1. Metilazione globale del DNA e metilazione dell'RNA nelle hAFSCs	61

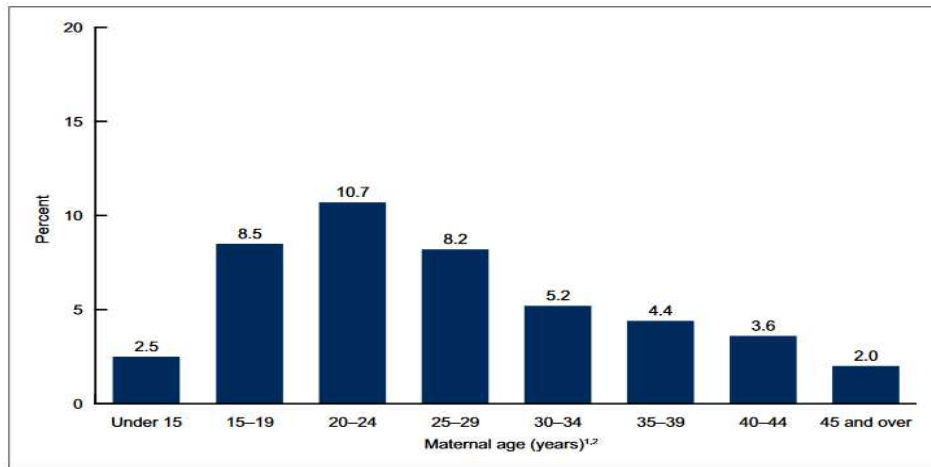
4.2.2. Espressione dei markers di pluripotenza	63
4.2.3. Analisi dell'espressione dei markers cellulari mediante citofluorimetria	64
4.3. Effetto della nicotina durante il differenziamento adipogenico delle hAFSCs	65
4.3.1. Valutazione del differenziamento: la colorazione	65
4.3.2. Espressione dei markers di pluripotenza post-differenziamento	66
4.3.3. Espressione dei markers adipogenici post-differenziamento	67
4.3.4. Analisi del profilo di espressione dei miRNA dopo il trattamento con nicotina	68
Capitolo V-Discussione	70
Capitolo VI-Conclusioni	77
Bibliografia	
Supplementary Table	

Capitolo I

INTRODUZIONE

1.1. Il fumo: un quadro epidemiologico del problema

Circa il 20-30% della popolazione mondiale al di sopra dei 15 anni di età, comprendente sia uomini che donne, fuma (Storr CL et al., 2010). I dati dell'indagine Eurobarometro 2017 dimostrano come in Europa il 26% degli europei fuma (di cui il 30% uomini e il 22% donne) e come siano in aumento i fumatori nella classe di età 15-24 anni (Ministero della Salute, 2018). Inoltre, secondo i dati pubblicati nel 2018 dall'americano "Centers for Disease Control and Prevention-National Center for Health Statistics" (CDC-NCHS), circa il 7.2% delle donne che ha avuto un figlio nel 2016, ha fumato in gravidanza. Ciò che più colpisce dai dati del CDC (Fig.1), è sicuramente il fatto che la prevalenza di donne fumatrici in gravidanza è molto alta più tra i 20 e i 24 anni (10.7%), seguita dai 15-19 anni (8.5%) e i 25-29 anni (8.2%), che tra i 35-39 anni (3.6%).



¹Significant differences among all age groups except between women under age 15 and women aged 45 and over ($p < 0.05$).
²Significant decreasing trend from women aged 20-24 to women aged 45 and over ($p < 0.05$).

NCHS, National Vital Statistics System, Natality.

Fig. 1 Dati del National Center for Health Statistics relativi alle donne fumatrici in gravidanza

Sicuramente, sull'abitudine al fumo influiscono la società e l'educazione ricevuta, come evidenziato anche da questi dati americani, ma i numeri continuano ad essere decisamente elevati (Drake P et al., 2018).

Al mantenimento di questa abitudine anche durante la gravidanza, sta contribuendo anche la diffusione di dispositivi alternativi alle sigarette definiti ENDS "Electronic Nicotine Delivery System". La Food and Drug Administration, ha definito gli ENDS come prodotti che contengono non soltanto nicotina ma anche propilen glicole, glicerina vegetale e altre sostanze. Il liquido a base di nicotina presente in questi dispositivi, per lo più "electronic cigarettes" (E-cig), viene scaldato per creare un aerosol che il consumatore va ad inalare (Breland A et al., 2019). Le E-cig vengono viste come dispositivi più sicuri e che predispongono alla cessazione dell'abitudine al fumo, per questo molte gestanti li utilizzano, ritenendoli meno dannosi per sé stesse e per il feto

(Wagner NJ et al, 2017). Al contrario, le E-cig contengono sostanze chimiche di diversa natura e la nicotina presente è in concentrazioni differenti a seconda del dispositivo, ma sempre dannose per il consumatore (Breland A et al., 2019).

1.2. La nicotina ed il suo metabolismo

La nicotina (Fig.2) è un naturale costituente del tabacco, nonché il principale alcaloide presente nelle sigarette e nei dispositivi basati sul consumo di tabacco.



Fig. 2 Formula chimica della Nicotina

Essa è considerata una delle principali sostanze in grado di dare dipendenza nei consumatori e anche una delle più dannose. Ciò soprattutto perché il fumo di sigaretta o di E-cig è un meccanismo complesso attraverso il quale il fumatore può decidere autonomamente la “dose di nicotina” da assumere. L’*intake* infatti, dipende dall’inalazione, dall’*espirazione*, dall’ambiente in cui si fuma e dall’*intesità* e frequenza dell’atto (Hukkanen J et al., 2005). In linea generale, come riportato anche da Benowitz et al. (2003), la dose di nicotina assorbita dall’organismo dopo una singola sigaretta va da 1 a 2 mg e circa l’80-90% di

nicotina inalata viene assorbita durante il processo del fumo attivo, mentre l'efficacia di assorbimento della nicotina da fumo passivo, per donne non fumatrici, varia intorno al 60-80%. L'assorbimento della nicotina dipende dal pH: essa deve essere ionizzata a pH leggermente acido per poter essere assorbita. Una volta assorbita attraverso gli alveoli polmonari, essa viene trasportata attraverso la circolazione sanguigna, dove ha una emivita di ~ 2 ore, anche se è stato dimostrato che nei fumatori l'emivita può essere allungata a 6-8 ore, a causa del lento rilascio di nicotina dai tessuti (Hukkanen J et al., 2005); in circolo la concentrazione varia, ma la concentrazione più alta che si registra a livello arterioso dopo la prima espirazione è di ~7 ng/ml (Rose JE et al., 1999). Infine la nicotina viene metabolizzata, soprattutto a livello epatico, prima grazie agli enzimi del citocromo P450 e poi grazie all'aldeide ossidasi, un enzima citoplasmatico. Per il 70-80% viene convertita in questo modo a cotinina, per il 4-7% viene metabolizzata a Nicotina N'-ossido da FMO3 e per il 3-5% viene glucuronidata ed escreta nelle urine (Hukkanen J et al., 2005). La cotinina ha un'emivita di ~16 ore ed è il biomarker che solitamente viene testato per valutare l'esposizione al fumo in quanto, proprio a causa dell'emivita, è facilmente evidenziabile nel siero, sia dei fumatori abituali, che dei fumatori occasionali ("light" smokers) e dei fumatori passivi (Florescu A et al., 2009).

Questo metabolita viene per il 10-15% escreto nelle urine tal quale e la restante percentuale viene ulteriormente metabolizzata (Hukkanen J et al., 2005).

1.3. Esposizione prenatale alla nicotina

Come già evidenziato, ancora una grande percentuale di donne continua a fumare in gravidanza esponendo non soltanto loro stesse ma anche il feto a sostanze chimiche potenzialmente dannose, come la nicotina. Diversi studi presenti in letteratura hanno dimostrato come la nicotina entri nella circolazione fetale attraverso la placenta, diffonda attraverso essa e poi sia escreta dal feto stesso nel liquido amniotico (Jacob N et al., 2017). Nella placenta e nel fegato fetale non sono presenti gli enzimi del citocromo P450, la nicotina quindi non viene metabolizzata in maniera diretta dal feto (Jacob N et al., 2017). La concentrazione totale della nicotina nel liquido amniotico dipende quindi da altri fattori tra cui il pH, in quanto l'assorbimento della nicotina è correlato proprio ad esso. Il pH del liquido amniotico è pari a 7.07 ± 0.08 e quello del sangue materno 7.42 ± 0.03 ; a causa di questa differenza, la concentrazione della nicotina nel liquido amniotico risulta essere circa due volte più alta rispetto alla concentrazione nella circolazione sanguigna materna (Luck W et al., 1985; Jacob N et al., 2017). Ciò, unito al fatto che durante la gravidanza la clearance di nicotina e cotinina aumenta rispettivamente del 60 e del 140% (Hukkanen J et al., 2005), fa sì che il feto risulti esposto a dosi molto più alte

di sostanze chimiche dannose rispetto la madre e ciò va a generare un effetto tossico che si ripercuote anche sulla placenta e sulla biologia delle cellule fetali (Jauniaux E and Burton GJ, 2007; Holbrook BD, 2016).

1.4. Effetti dell'esposizione prenatale al fumo

Il fumo di sigaretta è stato associato ad aborti spontanei e mortalità precoce come riportato in uno studio che dimostra come in donne esposte al fumo (0.1-15 ng/ml → cotinina/plasma) il rischio di un aborto risulta essere aumentato (Rogers JM, 2009). Questi non sono gli unici effetti negativi dell'esposizione a sostanze chimiche come la nicotina, ma solo l'epilogo di quanto può accadere nelle diverse fasi della gravidanza. Nonostante uno studio ritenga che, in una fumatrice, i villi coriali della placenta siano microscopicamente identici a quelli di una non fumatrice, in realtà si assiste ad una alterazione di tutte le funzioni biologiche della placenta (Jauniaux E and Burton GJ, 2007). La nicotina agisce legandosi al sito di legame dell'acetilcolina sui recettori nicotinici (ACh binding site), quest'ultima è una molecola segnale che controlla l'uptake dei nutrienti da parte della placenta, la vascolarizzazione e la circolazione sanguigna nella stessa; pertanto l'attivazione cronica di questi recettori provoca effetti patologici.

Un altro possibile effetto è stato individuato a livello del plasma fetale, tra la 12esima e la 17esima settimana di gestazione, in cui si è evidenziata la

diminuzione della concentrazione di alcuni amminoacidi fondamentali per le funzioni biologiche quali prolina, serina, leucina, arginina (Jauniaux E et al., 1999). Questo è in accordo con uno studio di Fischer et al. (2017), secondo cui dal secondo trimestre di gravidanza si verificano una serie di eventi a livello metabolico nel liquido amniotico prelevato da donne sottoposte anche a basse dosi di nicotina, come possono essere quelle esposte al fumo passivo. Nello specifico, nei campioni di liquido amniotico prelevati si verifica un'alterazione del metabolismo sia degli amminoacidi che degli acidi nucleici confermando quanto già espresso a livello della circolazione fetale.

Lo sviluppo fetale viene fortemente condizionato dall'abuso di tabacco e nicotina; difatti, associazioni positive sono state riscontrate tra il fumo in gravidanza e malformazioni a livello fetale, quali difetti cardiovascolari e del cuore, craniofacciali e difetti gastrointestinali (Hackshaw A et al., 2011). Non solo, anche il polmone fetale verrebbe interessato dagli effetti negativi da parte della nicotina: lo sviluppo dell'epitelio bronchiale ed endoteliale verrebbe infatti compromesso in caso di esposizione in utero al fumo (Gibbs K et al., 2016). A livello dell'epitelio bronchiale ed endoteliale sono presenti i recettori nicotinici dell'acetilcolina (nAChRs), che sono dei canali ionici pentamerici ligando dipendenti, i quali vengono attivati dal legame all'acetilcolina o ad un altro agonista (Wang I et al., 2001), pertanto il legame della nicotina a questi

recettori genererebbe una mancata regolazione del canale. Essendo i recettori nicotinici espressi anche a livello nervoso, la loro alterata attivazione potrebbe generare anche una serie di disturbi che interessano il sistema nervoso tra cui la morte improvvisa neonatale (SIDS-Sudden Infant Death Syndrome), in cui si verrebbe a verificare un'alterazione a livello dei centri nervosi che regolano la respirazione. Le cause della SIDS non sono del tutto chiare ma studi in letteratura dimostrano che, i topi esposti *in utero* a nicotina mostrano una ridotta risposta alla condizione di ipercapnia (Gibbs K et al., 2016). Gli effetti negativi si estendono anche alla sfera neurologica e comportamentale, anche in questo caso è riportata una importante associazione del fumo in gravidanza con deficit di attenzione e comportamenti aggressivi, ma non sono ancora del tutto chiarite le esatte cause di ciò (Rogers JM, 2009). Le più importanti e frequenti conseguenze sono il diminuito peso alla nascita e l'aumentata frequenza dei parti pretermine (Jacob N et al., 2017) e sono state correlate sia al fumo attivo che passivo. In particolare, secondo quanto riportato in uno studio presente in letteratura, si stima una diminuzione del 5% in peso del nascituro per ogni pacchetto di sigarette consumato e la stessa associazione è stata riscontrata anche per le fumatrici passive (Rogers JM, 2009). La diminuzione della crescita fetale causata dalla nicotina sembrerebbe quindi essere "dose-dipendente". Un altro studio ha evidenziato, infatti, che ogni settimana in cui la madre continua

a fumare porta ad una diminuzione della circonferenza addominale di 0.58 mm/sett, della lunghezza del femore di 0.19 mm/sett e della circonferenza della testa di 0.56 mm/sett (Jaddoe VW et al., 2007). Il basso peso unito ad una diminuzione nella crescita intrauterina può generare un aumento nel rischio di mortalità neonatale, un rischio da non sottovalutare dato il numero considerevole delle donne che continuano a fumare (Jacob N et al., 2017).

Tutti questi dati sicuramente dimostrano come l'esposizione al fumo e alla nicotina sia deleteria ad ogni step della gravidanza, ma non forniscono informazioni esaustive circa il meccanismo attraverso il quale si verificano le conseguenze negative.

1.5. Il ruolo dell'epigenetica

Attualmente l'esatta alterazione molecolare alla base dei danni nel feto, successivi all'esposizione *in utero* al fumo e alla nicotina non è nota. Tuttavia, alcuni degli effetti tossici sarebbero dovuti a processi genetici (Markunas CA et al., 2014). Difatti, secondo uno studio recente, uno dei principali effetti deleteri del fumo in gravidanza riguarda la riduzione della lunghezza dei telomeri dei cromosomi nei neonati (Salihu MH et al., 2015). L'accorciamento dei telomeri come noto, rappresenta un marker di invecchiamento biologico e sviluppo di malattie (Salihu MH et al., 2015). Da altri dati recenti però emerge che alla base di tutto ciò non ci sia soltanto una componente genetica, ma anche

epigenetica (Maccani MA and Knopik SV, 2012; Rogers JM, 2019). L'epigenetica rappresenta lo studio di tutti quei cambiamenti nell'espressione genica che sono ereditabili, ma che avvengono senza interessare la sequenza nucleotidica del DNA, che quindi rimane invariata (Bollati V and Baccarelli A, 2010). I meccanismi epigenetici meglio caratterizzati sono la metilazione del DNA e dell'RNA, le modificazioni post-traduzionali degli istoni, attorno ai quali il DNA è impacchettato e l'azione dei non-coding RNA, ovvero gli RNA non codificanti per proteine (Fig. 3).

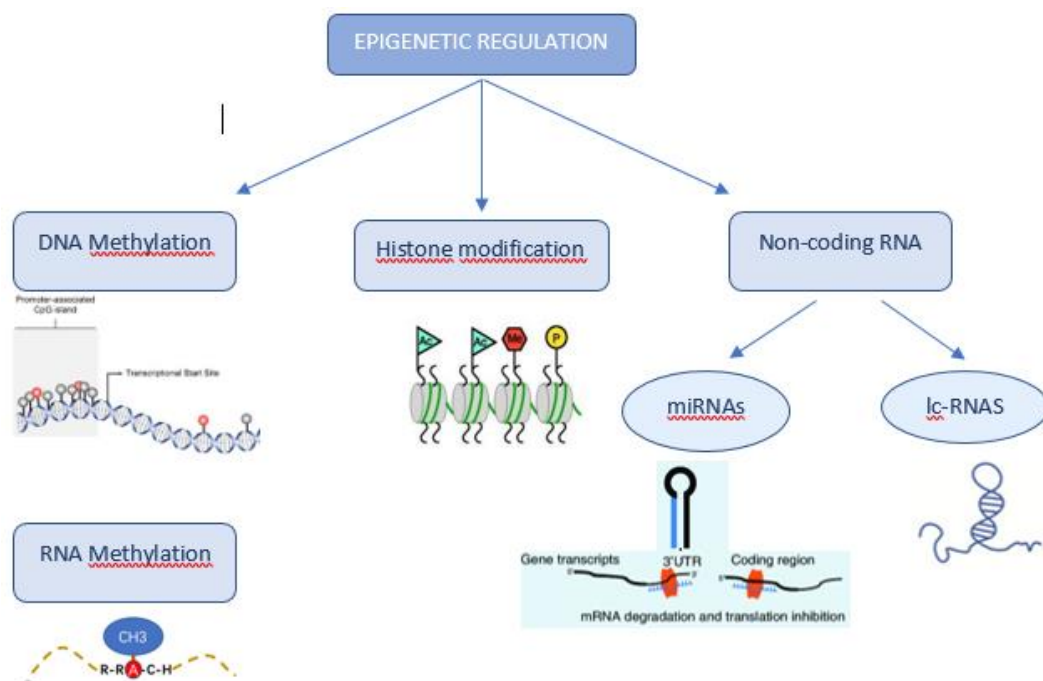


Fig. 3 I principali meccanismi della regolazione epigenetica

Possiamo pensare ai meccanismi epigenetici come a una serie di parametri che possono andare a variare la funzione genomica, sotto la spinta di differenti

fattori, ma al tempo stesso tali parametri vengono trasmessi da una generazione alla successiva, consentendo di trasmettere questo stato del DNA. “Environmental epigenomics” è la terminologia che è stata utilizzata proprio per indicare il fatto che esiste una correlazione tra il genoma e l’ambiente, sia a livello endogeno (dovuta agli ormoni o al sistema immunitario) che esogeno (ad esempio dovuta a nutrienti e sostanze chimiche) (Perera F et al., 2011). È quindi l’esposizione delle nostre cellule e del nostro DNA a specifici nutrienti, stress, sbalzi termici e inquinanti che andrà a predisporre l’organismo ad effetti, anche transgenerazionali, sullo sviluppo, sul metabolismo e sulla salute. Quanto detto può essere applicabile anche nell’ambito dell’esposizione fetale alla nicotina, dal momento che il periodo di sviluppo *in utero* rappresenta una fase importante, in cui un eventuale ambiente avverso potrebbe esporre il feto a maggiori rischi di sviluppare alterazioni e patologie.

1.5.1. Metilazione del DNA

La metilazione a livello del DNA è uno dei meccanismi epigenetici più investigati (Markunas CA et al., 2014). Esso prevede il trasferimento di un gruppo metilico CH₃ dalla S-adenosilmetionina (SAM) al carbonio 5 di una citosina legata ad una guanina (dinucleotide CpG). Questo trasferimento e quindi il mantenimento delle 5-metilcitosine (5mC) e la metilazione *de novo* sono mediati dalle DNA metiltrasferasi (DNMT1-3A-3B). Il profilo di

espressione di una cellula viene trasmesso in maniera stabile alle cellule figlie (Strachan T and Read A, 2016), pertanto anche il pattern di metilazione verrà trasmesso. Il meccanismo di metilazione, come noto, ha conseguenze importanti per la regolazione dell'espressione genica, determinando il "silenziamento" di alcuni geni: la metilazione delle citosine comporta sia l'interferenza con il legame di alcuni fattori di trascrizione al DNA, che la creazione di un sito di legame per metil-DNA binding proteins, le quali reclutando altre proteine, provocano il rimodellamento della cromatina, rendendola più condensata (Perera F et al, 2011). Inoltre la metilazione del DNA ha un ruolo importante anche nel mantenimento della stabilità e dell'integrità del genoma, in quanto provoca il silenziamento anche delle sequenze di DNA ripetuto e dei trasposoni endogeni (Bollati V and Baccarelli A, 2010). Nel nostro genoma soltanto una piccola percentuale (3-5%) delle citosine è metilata, dato che la 5mC è instabile chimicamente ed è quindi soggetta a deaminazione, un processo che consente la sua trasformazione in timina, una base naturale del DNA, che quindi non viene rimossa dai meccanismi di riparo della cellula. A causa di ciò in realtà, la frequenza di dinucleotidi CpG risulta essere inferiore rispetto alle attese, ma vi sono delle regioni nucleotidiche caratterizzate dall'aver la frequenza attesa di C e G; tali regioni sono appunto definite "isole CpG". Le isole CpG essendo ipometilate

o non metilate rappresentano dei marcatori genici perché associate a regioni trascrizionalmente attive che ritroviamo in prossimità dei promotori genici (Bollati V and Baccarelli A, 2010). L'importanza del pattern di metilazione è ormai ampiamente riconosciuta; sia la ipermetilazione che la ipometilazione del DNA, soprattutto a livello delle isole CpG, deregolano l'espressione genica e rappresentano un rischio aumentato di sviluppare una malattia (Perera F et al, 2011). Alterazioni dell'epigenoma, che avvengono nel periodo prenatale, possono quindi generare il rischio di sviluppare una patologia in epoca successiva. Vi sono almeno due diverse fasi nello sviluppo caratterizzate da stati di metilazione diversi: la fase pre-impianto dell'embrione è caratterizzata da ipometilazione; una volta impiantato, i livelli di metilazione del DNA vengono ripristinati per poi assistere ad un altro cambiamento durante l'embriogenesi, nelle cellule germinali (Bollati V and Baccarelli A, 2010). Alla luce di ciò, si evidenzia come sia fondamentale quindi il mantenimento del pattern di metilazione del DNA. Tuttavia l'esposizione ad inquinanti come il fumo in epoca prenatale incide sullo stato di metilazione. Uno studio del 2009 mostra come la metilazione del DNA sia inferiore nei bambini che a livello uterino erano stati esposti al fumo di sigaretta (Breton CV et al., 2009), allo stesso modo un altro studio riporta come neonati, con elevati livelli sierici di cotinina, abbiano nel sangue cordonale un livello di metilazione globale del

DNA inversamente proporzionale ad essa (Suter M et al., 2011). Altri studi, in particolare studi Genome-Wide, analizzando le isole CpG e i livelli di metilazione gene-specifica, hanno identificato diversi geni che potrebbero essere implicati in alcuni dei principali effetti negativi per il feto, successivi all'esposizione al fumo. Nello specifico, sono state identificate circa 3000 isole CpG con un diverso pattern di metilazione nella prole di donne fumatrici in gravidanza e tale pattern sembrerebbe mantenersi anche durante il primo periodo dopo la nascita (Joubert BR et al., 2016). Secondo Markunas et al. (2014) molti dei geni identificati sembrerebbero essere implicati nella dipendenza da nicotina e nello sviluppo dell'embrione e della placenta. Sicuramente, il fumo attivo e passivo, come anche la frequenza e l'intensità del consumo di nicotina, provocano un diverso stato di metilazione del DNA, ma ciò che è fondamentale continuare ad indagare è la persistenza di questi cambiamenti epigenetici, la loro correlazione con gli altri meccanismi epigenetici e soprattutto quali alterazioni a livello biologico o clinico possono derivare da essi.

1.5.2. Metilazione dell'RNA

Diverse modificazioni epigenetiche sono state identificate a livello di mRNA, tRNA, rRNA e ncRNA. Tra queste modifiche quella più diffusa è sicuramente la metilazione post-trascrizionale a livello dell'azoto o dell'ossigeno

dell'adenosina, che avviene grazie al gruppo metile donato dalla SAM (S-Adenosilmetionina), consentendo la formazione della m⁶A (N⁶-metiladenosina) (Niu Y et al., 2013). La m⁶A rappresenta circa l'80% delle basi metilate nel messaggero e non è soggetta a modifiche chimiche come nel caso della bisulfitazione per la detection delle 5-mC del DNA. Sebbene la metilazione a livello dell'RNA sia stata identificata da tempo, ad oggi la funzione biologica non è ancora del tutto chiara, dal momento che, il meccanismo di azione, risulta correlato alla localizzazione delle basi metilate. Le m⁶A si ritrovano in cluster e tendono ad essere presenti a livello delle sequenze codificanti (CDS), delle regioni fiancheggianti il codone di stop e delle 3' UTR (Niu Y et al., 2013). Il processo di metilazione è condotto da due metiltrasferasi METTL14 e METTL3 che formano un complesso stabile grazie anche alla proteina WTAP (Liu J et al., 2014), ed è reversibile grazie alle due demetilasi di recente scoperta, FTO e ALKBH5 (Fig. 4).

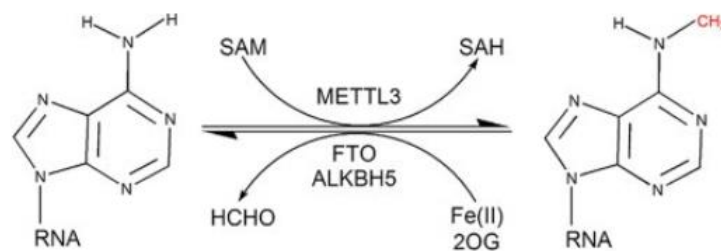


Fig. 4 Metilazione reversibile a livello dell'RNA

Questa modifica epigenetica sembra essere implicata nei processi di trascrizione, splicing, export nucleare, traduzione e stabilità dell'RNA, ed il

coinvolgimento delle due demetilasi FTO e ALKBH5, rende la metilazione a livello dell'adenosina un marker epigenetico da indagare, in quanto potenzialmente coinvolto in processi biologici fondamentali: lo sviluppo, il rinnovo delle cellule staminali, la carcinogenesi e l'adipogenesi (Niu Y et al., 2013)

1.5.3. Modifiche post-traduzionali degli istoni

Il DNA è complessato con proteine e soggetto ad avvolgimenti e superavvolgimenti, formando la cromatina (Strachan T and Read A, 2016). La cromatina esiste in diverse forme: l'eterocromatina costitutiva, che è altamente condensata e geneticamente inattiva, l'eterocromatina facoltativa, che in alcuni casi può essere geneticamente attiva e l'eucromatina, più lassa e funzionalmente attiva (Strachan T and Read A, 2016). L'unità fondamentale del DNA impacchettato è il nucleosoma: esso è costituito da un tratto di 147 bp di DNA avvolto per due giri attorno ad un nucleo centrale di otto proteine istoniche H2A, H2B, H3, H4. Nucleosomi adiacenti sono collegati da un tratto di DNA spaziatore, la cui lunghezza varia tra le regioni del genoma. Un istone H1 lega questo DNA spaziatore, contribuendo all'impacchettamento del DNA. Una coda di amminoacidi protrude dal nucleo istonico e viene interessata da una serie di modificazioni post-traduzionali (PTMs) quali tra cui l'acetilazione e la deacetilazione, la metilazione, la fosforilazione e altre (Strachan T and

Read A, 2016) (Fig. 5). Queste modifiche interessano quindi la struttura della cromatina e possono provocare delle variazioni nell'accessibilità al DNA da parte di fattori di trascrizione e proteine che possiedono un DNA-binding domain, andando quindi ad attivare o inattivare l'espressione genica e causando anche in questo caso delle alterazioni nella regolazione genica che possono portare allo sviluppo di alcune patologie.

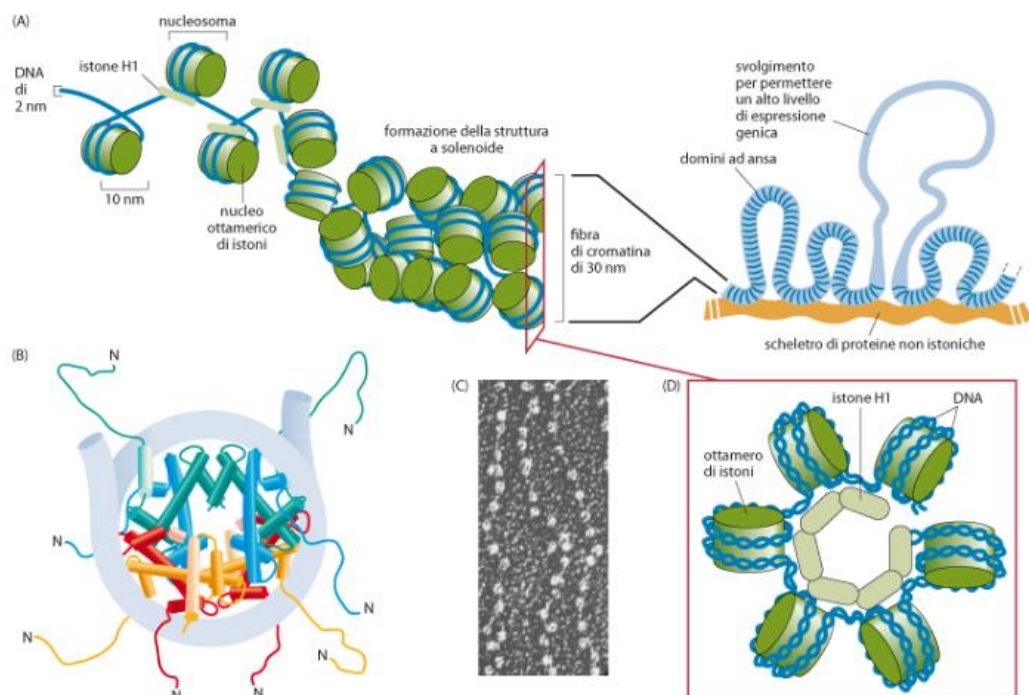


Fig. 5 Organizzazione del nucleosoma: nella figura B sono evidenti le code istoniche oggetto di PTMs.

(Strachan T and Read A, 2016)

Le code istoniche vengono modificate da enzimi modificatori che vengono classificati in grandi famiglie tra cui le iston acetiltrasferasi (HATs), iston

metiltrasferasi (HMTs), le iston deacetilasi (HDACs) e demetilasi (HDMs) che mediano effetti opposti (Sundar IK and Rahman I, 2016). Queste modifiche nel loro insieme definiscono un “codice istonico”, in quanto particolari combinazioni di modificazioni vanno a determinare la conformazione della cromatina e nessuna modificazione singolarmente permette di prevedere l’esatto stato della cromatina o l’attività del DNA (Strachan T and Read A, 2016). È una rete di interazioni a determinare il risultato finale, ci possono quindi essere modificazioni interdipendenti, in cui una modificazione è conseguenza dell’altra e la variazione di queste potrebbe cambiare tutto il pattern.

In linea generale è noto che le più comuni tra le PTMs sono l’acetilazione e la metilazione delle lisine a livello degli istoni H3 e H4. L’aumento dell’acetilazione induce l’attivazione della trascrizione genica invece la metilazione è associata sia all’attivazione che all’inattivazione genica, a seconda del residuo coinvolto (Bollati V and Baccarelli A, 2010). Gli enzimi coinvolti nelle PTMs possono agire in risposta a stimoli ambientali come l’esposizione al fumo di sigaretta (Sundar IK and Rahman I, 2016), ed è stato ipotizzato che questo stimolo vada ad alterare l’espressione di queste proteine a livello delle cellule epiteliali bronchiali. Effettivamente è stata dimostrata una disregolazione nell’espressione genica di diversi enzimi tra cui HATs e HMTs,

che potrebbe essere la causa di alcune patologie del polmone derivanti dall'esposizione al fumo. Attualmente esistono pochissimi dati riguardo i cambiamenti epigenetici a livello della cromatina nelle donne in gravidanza e nella prole esposta al fumo, ma quanto dimostrato per le cellule epiteliali del polmone potrebbe aprire la strada a nuovi studi in questo senso.

1.5.4. Regolazione dell'RNA

I meccanismi sopra descritti non sono gli unici responsabili della modulazione epigenetica dell'espressione genica. Difatti dalla scoperta che solamente l'1.1% del genoma codifica per proteine (Strachan T and Read A, 2016), si è cercato di indagare sulla funzionalità del cosiddetto "*junk DNA*", ovvero la restante porzione di genoma. È noto che ad essere trascritto è l'85-90% del genoma, pertanto una buona parte dell'eucromatina è rappresentata, nei trascritti primari prodotti, da almeno una delle due eliche di DNA (Strachan T and Read A, 2016). Molti degli RNA sono infatti trascritti nella stessa modalità degli mRNA, ma non vengono tradotti in proteina, per tale motivo essi vengono denominati complessivamente come non-coding RNA (ncRNA). I ncRNA rappresentano un potente meccanismo di silenziamento genico ereditario, non associato a cambiamenti nucleotidici nella sequenza del DNA ma alla formazione di complessi che vanno a silenziare l'espressione genica (meccanismo noto come RNA-interference, RNAi). L'interferenza dell'RNA,

prevede la formazione di un corto duplex a RNA, che viene legato da complessi proteici che contengono una endonucleasi. L'endonucleasi degrada prima uno dei due filamenti di RNA, poi, attraverso l'appaiamento del filamento guida rimasto ad un target, degraderà quest'ultimo (Strachan T and Read A, 2016). Fra i ncRNA più indagati ci sono i long non-coding RNA, i piwi RNA ed i microRNA. I long non-coding RNA (*lcrNA*) sono degli RNA lunghi più di 200 nt, questa lunghezza li differenzia dai microRNA e i piwi RNA. A differenza di alcuni tipi di ncRNA, che si caratterizzano per avere sequenze molto conservate tra le varie specie, i lcrNA non hanno questa caratteristica, pertanto si è pensato che essi fossero non funzionali (Maccani MA and Knopik SV, 2012). In realtà la scoperta del lcrNA "Xist" ha riaperto gli studi su questo tipo di RNA. Xist viene espresso dal cromosoma X che verrà inattivato, provocando delle modificazioni a livello della cromatina come la deacetilazione e la demetilazione dell'istone H3 (a livello H3K9 e H3K4) che, assieme ad altri cambiamenti, porta al silenziamento dei geni sul cromosoma X, consentendo quindi ad uno solo dei due cromosomi di essere attivo (Maccani MA and Knopik SV, 2012). Attualmente diversi studi cercano di capire come i lcrNA siano coinvolti nella tumorigenesi e ulteriori studi si focalizzeranno sul determinare come questi long non-coding RNA rispondono all'esposizione a fattori inquinanti come il fumo.

I *piRNA* sono un'altra classe di ncRNA, così chiamati in quanto interagiscono con le proteine Piwi (Strachan T and Read A, 2016). Si tratta di RNA lunghi generalmente tra i 24 e i 32 nt, derivanti da diversi "RNA single strand" (ssRNA) che vengono trascritti a partire da sequenze ripetute intergeniche (Maccani MA and Knopik SV, 2012). Le proteine PIWI e gli RNA associati ad esse sembrerebbero essere coinvolti in una serie di processi chiave durante lo sviluppo germinale, nel silenziamento dei trasposoni (Maccani MA and Knopik SV, 2012). Essi sono anche espressi nei tessuti somatici, dove agiscono modulando l'espressione genica, inducendo sia modificazioni istoniche, che la metilazione del DNA (Nogueira J and Andressa N et al., 2017). Nonostante diversi studi abbiano messo in luce la loro importanza, devono essere ancora chiariti i meccanismi di azione e se anch'essi possano essere coinvolti nell'attivazione di quei processi biologici alla base dei danni dovuti all'esposizione alla nicotina in gravidanza.

I microRNA (*miRNA*), sono probabilmente i piccoli RNA più studiati. Sono degli RNA a singolo filamento lunghi circa 22 nt e sono in grado controllare l'espressione genica degradando o bloccando la traduzione di specifici mRNA, ibridandosi ad essi (Pritchard CC et al., 2012). I miRNA funzionano come molecole guida, in grado di legarsi alla molecola target di mRNA a livello della regione regolatrice della 3' UTR. Formano con gli altri meccanismi epigenetici

un circuito in grado di controllare l'espressione genica. La loro espressione nel nucleo cellulare è strettamente controllata da specifici fattori di trascrizione, che rendono il profilo di espressione dei miRNA unico per ogni tessuto (Lock MC et al., 2017). Inoltre un unico micro RNA è in grado di regolare centinaia di trascritti, ciò avviene perché da un singolo RNA ne possono derivare molti di più a causa di variazioni nella loro lunghezza e perché, in molti casi, il legame del miRNA al trascritto bersaglio coinvolge un numero, anche significativo, di appaiamenti errati (mismatch) (Pritchard CC et al., 2012). Circa il 50% dei geni codificanti per i miRNA nei mammiferi si trova in cluster, pertanto derivano da un unico trascritto che verrà processato successivamente, sebbene ci siano anche delle eccezioni, come quei miRNA i cui geni si trovano negli introni di altri geni (Kim VN et al., 2009) o nella 3' UTR.

La biogenesi di molti geni codificanti per miRNA avviene per opera della RNA polimerasi II (Pol II), altri che sono associati a ripetizioni Alu, vengono trascritti dalla RNA polimerasi III (Pol III). I trascritti primari, definiti pri-miRNA (primary miRNA), possiedono un cappuccio al 5' e una coda di poliA al 3' e sono ripiegati a formare delle strutture a forcina. Successivamente essi subiscono un processo di maturazione in più step, ad opera di complessi proteici ribonucleasici (Strachan T and Read A, 2016) (Fig. 6). Nel nucleo vengono clivati ad opera di una RNase di tipo III (RNASEN o Drosha) che forma un

complesso ribonucleasico con un cofattore denominato DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region 8). Quest'ultimo interagisce con il pri-miRNA a livello della regione tra l'RNA a singolo e doppio filamento e supporterà RNASEN nel taglio, che lascerà due nucleotidi sporgenti al 3'. La struttura a forcina di 60-70 nt formata viene esportata nel citoplasma ad opera dell'Esportina 5 (EXP5), sfruttando l'idrolisi del GTP. EXP5 riconosce le estremità sporgenti di quello che viene ora definito pre-miRNA (precursor miRNA).

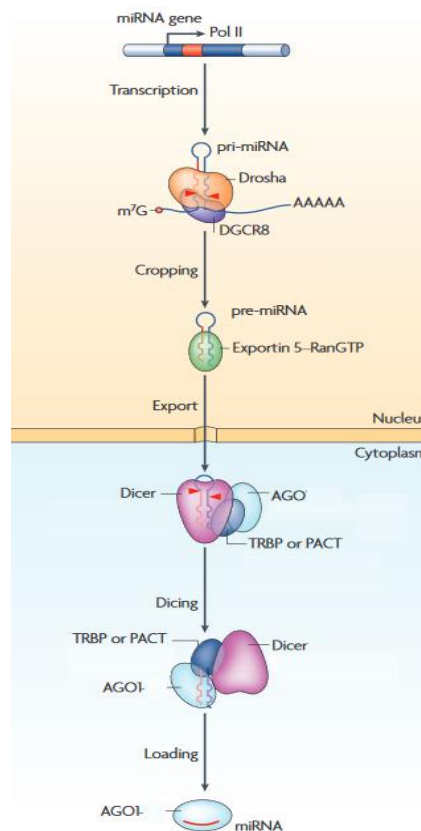


Fig. 6 Biogenesi dei miRNA. (Kim VN et al., 2009)

Nel citoplasma Dicer, una RNase III, assieme a due proteine che agiscono da cofattori, TRBP e PACT, cliva a livello del loop del pre-miRNA, rilasciando un filamento di dsRNA ad estremità sporgenti. Dicer, assieme con TRBP e PACT, forma il complesso RISC (RNA-induced silencing complex). Quindi al complesso RISC si va ad aggiungere la proteina Argonauta (Ago), ad attività endonucleasica, reclutata da TRBP; la proteina Ago è responsabile della selezione del cosiddetto filamento guida ovvero il miRNA maturo e della degradazione del filamento passeggero (Kim VN et al., 2009; Strachan T and Read A, 2016) I miRNA possono modulare l'espressione genica attraverso diversi processi. Se si verifica un perfetto appaiamento miRNA-mRNA, si assiste al taglio endonucleolitico ad opera della proteina Ago che genera due frammenti privi del cap al 5' o della coda di poliA al 3'. Ciò rende l'mRNA suscettibile all'attacco da parte delle RNAsi, provocandone la degradazione. Nel caso di un appaiamento imperfetto tra il miRNA e la regione 3' UTR del target, si verifica la deadenilazione dell'mRNA a livello della coda di poli(A), provocando anche in questo caso l'attacco da parte delle RNAsi. Altri processi suggeriscono invece che, i miRNA regolino l'espressione genica inibendo l'innescamento della traduzione dell'mRNA, a livello del riconoscimento del cap o, in una fase successiva, impedendo l'associazione tra le subunità dei ribosomi oppure ancora, che causino la proteolisi del peptide nascente o la dissociazione

dei ribosomi dall'mRNA (“drop off”), impedendo la prosecuzione della traduzione. Inoltre, dal momento che, i “messaggeri silenziati” sono stati riscontrati a livello di foci citoplasmatici definiti “processing bodies” (P bodies), un altro possibile meccanismo di modulazione dell'espressione genica è rappresentato proprio dal sequestro temporaneo di questi mRNA target (Eulalio A et al., 2008).

1.6. L'effetto della nicotina sull'espressione dei miRNA

In letteratura ci sono numerosi studi riguardo l'effetto del fumo sullo stato di metilazione del DNA nella prole, invece pochi sono quelli riguardo le modificazioni istoniche sul feto o quelle sui non-coding RNA, indotte dal fumo in gravidanza (Rogers JM, 2019). Soltanto negli ultimi anni, si è cercato di indagare le relazioni biologiche tra il fumo di sigaretta e sostanze inquinanti come la nicotina e l'espressione di ncRNA. In particolare si è prima cercato di capire come l'esposizione agli inquinanti ambientali potesse influenzare l'espressione dei microRNA (Maccani MA and Knopik SV, 2012), per poi concentrarsi sull'esposizione agli inquinanti *in utero*. È emerso che, nei fumatori il trascrittoma subisce delle alterazioni dovute alla disregolata espressione dei microRNA, queste variazioni nell'espressione dei miRNA sono state correlate all'aumentata proliferazione cellulare e alla tumorigenicità a livello del polmone (Xi S et al., 2010). In particolare è stato dimostrato come

l'esposizione al fumo di sigaretta vada ad intensificare l'espressione del miR-31 che sembrerebbe agire favorendo il fenotipo maligno delle cellule cancerose (Xi S et al., 2010). Altri studi si sono focalizzati sull'individuare la capacità del fumo passivo di indurre effetti sovrapponibili a quelli del fumo diretto, valutando l'espressione dei miRNA a livello del polmone dei ratti. Ciò che è emerso, da questo studio di Izzotti et al. (2009), è che risultano downregolati una serie di microRNA coinvolti nella proliferazione, nell'apoptosi e nell'angiogenesi ovvero in quei processi che avvengono durante la tumorigenesi.

Per quanto concerne gli effetti deleteri dell'esposizione al fumo sia a livello materno che a livello fetale, l'obiettivo di alcuni studi in letteratura è stato quello di valutare se questi effetti negativi, a livello prenatale, potessero essere dovuti ad una alterazione del pattern di espressione dei microRNA e in quali processi essi fossero coinvolti. Come è noto la placenta, rappresenta un organo molto importante per la crescita e lo sviluppo fetale, è stato quindi condotto uno studio volto ad indagare se il fumo di sigaretta in gravidanza potesse essere associato ad una espressione differenziale dei miRNA a livello della placenta stessa (Maccani MA et al., 2010). Un ulteriore studio è stato condotto trattando linee cellulari derivanti dalla placenta con due dei principali componenti delle sigarette: nicotina e benzoapirene (Maccani MA et al, 2010), per testare gli

eventuali cambiamenti a livello dell'espressione dei microRNA, verificando che effettivamente il miR-146a risultava downregolato. Inoltre è stata anche dimostrata una correlazione tra alcuni di questi non-coding RNA e la trascrizione dell'IGF1, un fattore di crescita che, è coinvolto anche nello sviluppo polmonare (Zakarya R et al., 2019). Uno studio nei topi mostra che l'esposizione al fumo in epoca prenatale provoca una alterazione a livello dell'espressione di circa 133 miRNA espressi a livello del polmone fetale murino (Zakarya R et al., 2019), dimostrando che, il pattern di espressione può essere alterato non soltanto a livello materno, ma anche a livello fetale e successivamente neonatale. Tutti questi dati sottolineano l'importanza dei miRNA e del loro studio sia del punto di vista del profilo di espressione che dell'individuazione dei potenziali target (Maccani MA and Knopik SV, 2012).

1.7. Cellule staminali umane da liquido amniotico come modello cellulare

Nonostante attualmente si sia ampliata la conoscenza sulla base genetica di molte malattie, alcune di esse non sono ancora curabili, dal momento che mancano informazioni sulla sequenza di eventi che ne determina la patogenesi. Se i difetti cromosomici o le variazioni geniche sono presenti in tutte le cellule, non è lo stesso per quanto riguarda le alterazioni funzionali, che invece, in alcuni casi possono interessare solo alcuni tessuti che talora possono essere difficili da studiare data la loro localizzazione (Antonucci I et al., 2016).

Sicuramente possono essere utilizzati a tal proposito modelli animali, ma in diversi casi è necessario validare gli studi anche su modelli cellulari umani, a causa degli specifici pathways di alcune condizioni biologiche. A tal proposito, le cellule staminali umane rappresentano un importante modello per conoscere le basi molecolari di malattie genetiche e per effettuare studi funzionali volti ad identificare proprio i pathways molecolari, oltre che i nuovi approcci terapeutici. Sia le cellule staminali embrionali (ES) sia le cellule staminali pluripotenti indotte (iPS) rappresentano due modelli cellulari utilizzati per lo studio dei meccanismi molecolari alla base di diverse patologie (Antonucci I et al., 2016). Le ES sono cellule derivanti dalla massa interna della blastocisti e in grado di differenziare in qualsiasi tipo cellulare, compresi gli annessi embrionali, pertanto sin dalla loro scoperta risultano essere oggetto di diverse controversie etiche, difatti oggi il loro uso è nei vari paesi limitato. Le iPS sono cellule fibroblastoidi che possono essere riprogrammate, ripristinando la caratteristica di pluripotenza. Queste cellule hanno aperto la strada a diversi studi sulle patologie a base genetica, tuttavia anch'esse mostrano una serie di limiti tra cui la difficoltà nell'andare a distinguere falsi positivi e negativi ed il fatto che non sempre la "memoria epigenetica" risulta essere completamente azzerata e ciò può influenzare le applicazioni di questo tipo di cellule come modello cellulare (Kim K et al., 2010). Le cellule staminali umane da liquido

amniotico (human Amniotic Fluid Stem Cells - hAFSCs), sono delle cellule derivanti dal liquido amniotico prelevato durante l'amniocentesi nel primo o nel terzo trimestre di gravidanza. Si tratta di una popolazione eterogenea di cellule, classificate sulla base delle caratteristiche di crescita e morfologiche in: cellule epitelioidi (E-type), cellule amniotic-fluid specific (AF-type) e fibroblasti (F-type) (Pipino C et al., 2015). Le AF-type e le F-type compaiono appena messe in coltura, le E-type solitamente appaiono successivamente e non sono presenti in tutti i liquidi amniotici (Antonucci I et al., 2016). Le hAFSCs sono cellule che mostrano la capacità di autorinnovarsi, possono essere espanse in colture feeder layer-free, in vitro mantengono sia il cariotipo che la lunghezza dei telomeri e, se trapiantate in topi nudi, non danno teratogenicità (Pipino C et al., 2015; Antonucci I et al., 2016). Mantengono la morfologia durante i vari passaggi della coltura e soprattutto esprimono dei markers di pluripotenza sia a livello del mRNA che a livello delle proteine. I marker di pluripotenza che sono stati studiati nelle hAFSCs sono OCT4, NANOG, SOX2, c-MYC e KLF4, sono inoltre positive per markers mesenchimali tra cui il CD90, CD105, CD73 (Antonucci I et al., 2016). Oltre a ciò, alcuni gruppi di ricerca hanno dimostrato anche che queste cellule hanno delle caratteristiche comuni con le cellule germinali primordiali (PGC), data l'espressione di markers come Stella, Fragilis, c-Kit e DAZL (Antonucci I et al., 2016). Difatti

le cellule staminali da liquido amniotico c-Kit⁺ possono formare i corpi embrioidi (EB) proprio come le cellule ES; i corpi embrioidi sono degli aggregati tridimensionali che riproducono lo step iniziale dell'embriogenesi e fondamentale per le PGC, affinché differenzino nei tre foglietti embrionali. Esperimenti in vitro hanno mostrato la capacità delle hAFSCs di differenziare in tutti e tre i foglietti germinali, in particolare in senso osteogenico, condrogenico, adipogenico, neurale e cardiomiogenico (Pipino C et al., 2015; Antonucci I et al., 2016). Questa capacità è dimostrata anche dall'espressione di markers di differenziamento come GATA e Cofilina 1, ma anche Galectina 1 e Transgelina che sono stati espressi in queste cellule (Pipino C et al., 2015). Studiando il proteoma di queste cellule è stata riscontrata anche la presenza di proteine ad azione antiossidante come la tioredoxina, la perossiredoxina e la glutatione trasferasi; ciò mostra come queste cellule abbiano una buona plasticità e, oltre la capacità proliferativa e differenziativa, anche una capacità di resistere allo stress ossidativo (Pipino C et al., 2015). Le proprietà di queste cellule le rendono pertanto, in grado di essere utilizzate come modello per studiare i meccanismi molecolari che sono alla base delle malattie. Recenti studi dimostrano che possono essere riprogrammate in maniera da ripristinare la pluripotenza nativa (Hawkins KE et al., 2017) e, la loro natura consente di essere studiate per la possibilità di essere trapiantate in un organismo ma anche

di essere sfruttate per testare la tossicità di farmaci nel loro ambiente biologico (a differenza dell'utilizzo di cellule modificate) e per studiare sia l'effetto diretto che transgenerazionale delle alterazioni epigenetiche (Di Tizio D et al., 2018) (Fig.7).

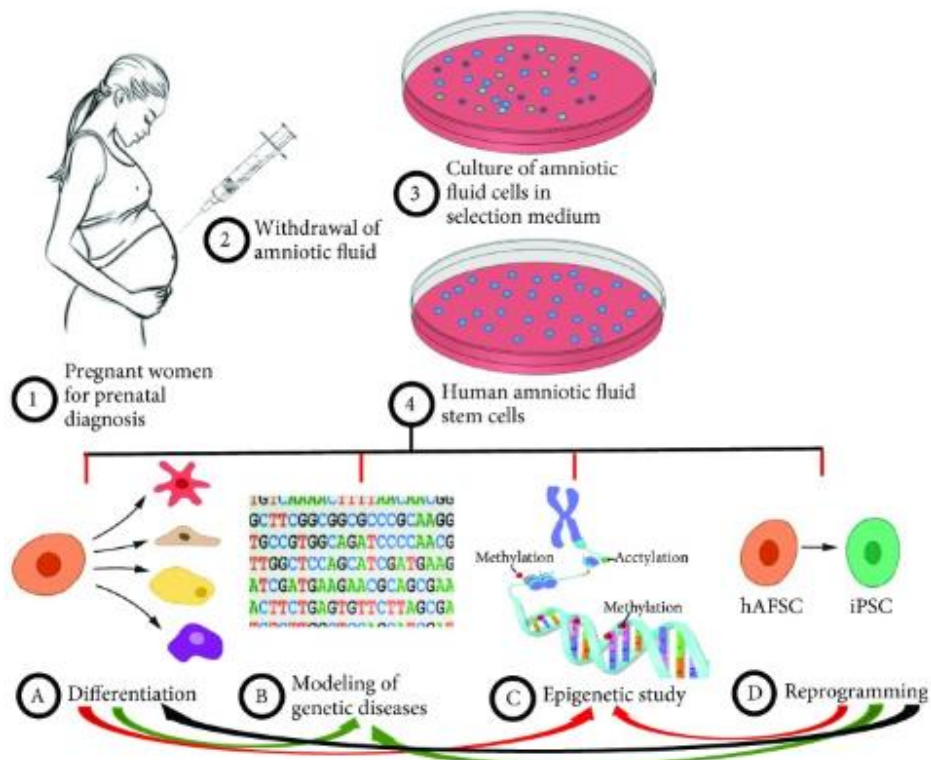


Fig. 7 I diversi tipi di applicazioni delle hAFSCs.

(Di Tizio D et al., 2018)

Capitolo II

SCOPO DELLA TESI

L'interazione tra l'ambiente e i geni avviene attraverso meccanismi epigenetici, che riescono a modulare e determinare la fitness di un organismo. L'esposizione a fattori ambientali di natura diversa avviene durante tutta la vita di un individuo e può influenzare lo sviluppo, lo stato di salute e la qualità della vita dell'individuo stesso (Maccani MA and Knopik SV, 2012). Anche gli effetti derivanti da questa esposizione possono verificarsi durante tutta la vita dell'individuo e saranno dipendenti dal tempo, dalla frequenza e dall'intensità dell'esposizione stessa. In particolare il periodo dello sviluppo *in utero*, rappresenta una fase essenziale in cui l'esposizione a fattori ambientali può provocare effetti negativi sulla crescita del feto e sul suo sviluppo, aumentando anche il rischio di "outcomes" negativi nel neonato. Il fumo di sigaretta può essere annoverato tra i fattori ambientali che in questo senso incidono in senso negativo. Molte sono infatti le donne che continuano a fumare in gravidanza o sono esposte al fumo passivo, esponendo quindi non soltanto loro stesse ma anche il feto ai rischi dovuti al consumo di sigarette. I danni relativi all'esposizione al fumo attivo e passivo possono verificarsi in tutti i trimestri della gravidanza (Jauniaux E and Burton GJ, 2007). A livello embrionale e fetale si verificano alterazioni nella morfologia e nel corretto sviluppo di tutti

gli organi (Hackshaw A et al., 2011); inoltre si assiste ad uno scorretto funzionamento dei principali apparati, quali quello respiratorio, cardiovascolare e ad un incremento del rischio di alterazioni anche a livello neurologico e comportamentale (Holbrook BD, 2016), nonché ad un aumentato rischio di SIDS (Rogers, JM, 2009). Tra le conseguenze negative più frequenti troviamo la nascita pretermine (Rogers, JM, 2009) che determina una riduzione importante del peso alla nascita. Il ridotto peso alla nascita è associato ad un aumento della mortalità e della morbilità ma ad oggi non ne si conosce l'esatto pathway alla base. La nicotina, il principale composto organico presente nel tabacco, una volta assorbita, riesce facilmente ad essere trasportata nella circolazione fetale e, assieme al suo metabolita cotinina, è presente a livello del liquido amniotico (Jacob N et al., 2017). Pertanto diversi studi (Jauniaux E and Burton GJ, 2007; Holbrook BD, 2016) la ritengono responsabile dei principali effetti avversi a livello embrionale e fetale. Alcuni studi su modello animale hanno dimostrato come nei ratti, l'esposizione alla nicotina in epoca prenatale e durante l'allattamento, provochi nella prole sia una alterazione della lipogenesi e del profilo metabolico dei lipidi (Fan J et al., 2016) che un incremento della lipolisi e dei livelli di acidi grassi liberi circolanti, in seguito ad una possibile attivazione da parte della nicotina della proteina AMP-chinasi $\alpha 2$ (AMPK $\alpha 2$) negli adipociti (Wu Y et al., 2015). Nonostante questi studi

preliminari su modelli animali, ad oggi non si conosce l'esatto pathway che conduce alle alterazioni che si verificano nell'uomo. Ciò su cui sembrano concordare recenti studi in letteratura è che alla base di molti degli effetti avversi dovuti al fumo ci siano meccanismi epigenetici, che si traducono sia in una alterazione nella metilazione degli acidi nucleici (Markunas CA et al., 2014) che nell'alterazione del profilo di espressione dei ncRNA (Maccani MA and Knopik SV, 2012; Lock MC et al., 2017), la quale però non è ancora stata ampiamente valutata. Lo scopo della tesi è quindi, quello di investigare il ruolo della nicotina nei cambiamenti epigenetici, utilizzando le cellule staminali umane da liquido amniotico, differenziate in senso adipogenico e studiando l'espressione differenziale dei micro RNA dopo il trattamento delle stesse con la nicotina. Pertanto, le hAFSCs utilizzate rappresenteranno un modello in vitro per verificare i possibili effetti genetici ed epigenetici della nicotina a livello fetale.

Capitolo III

MATERIALI & METODI

3.1. Raccolta dei campioni e messa in coltura delle hAFSCs

Il progetto condotto ha previsto la raccolta dei campioni di liquido amniotico (n=5) da donne che sono state sottoposte ad amniocentesi la 16esima e la 18esima settimana di gestazione e il cui campione è pervenuto a scopo di diagnosi prenatale presso la U.O. di Genetica Medica dell'ospedale SS. Annunziata di Chieti. Nel progetto non sono stati inclusi feti presentanti alterazioni strutturali o nel numero dei cromosomi, visibili a livello citogenetico. Sono inoltre state escluse dalla raccolta dei campioni le donne che avevano dichiarato un consumo di sigarette anche sporadico. Prima dell'inclusione nello studio, le gestanti sono state valutate anche per la presenza di infezioni in atto e consumo di farmaci in modo da eludere un possibile effetto epigenetico di tali fattori. I liquidi utilizzati come controlli, sono stati raccolti nelle stesse modalità già descritte. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università di Chieti-Pescara e tutte le gestanti incluse nello studio hanno firmato il consenso informato. La messa in coltura delle AFSCs è avvenuta dopo centrifugazione del liquido amniotico (2-3 ml) per 5 min a 1500 rpm, quindi, dopo aver scartato il surnatante, il pellet è stato messo in coltura in piastre petri da 60 mm. È stato utilizzato un terreno Iscove's Modified

Dulbecco's Medium (IMDM), supplementato con il 20% di siero fetale bovino (FBS), 100 U/ml di penicillina, 100 u/ml di streptomina, 2 mM di L-Glutamina (tutti reagenti Sigma-Aldrich) e 5 ng/ml del fattore di crescita di fibroblasti (β FgF) (Invitrogen, Thermofisher Scientific). Quindi le piastre sono state incubate a 37°C, al 5% CO₂ in un'atmosfera al 95% di umidità. Il terreno utilizzato, caratterizzato da un elevato contenuto di FBS, insieme all'utilizzo del IMDM risulta essere in grado di selezionare una popolazione omogenea di cellule. A ~ l'80% di confluenza le cellule sono state trattate con tripsina in acido etilendiamminatetraacetico (EDTA) allo 0.05% (Carlo Erba) e splittate ogni due giorni circa fino al 5° passaggio (Antonucci I et al., 2014).

3.2. Nicotina e MTS-Assay

La nicotina è stata preparata fresca per ogni trattamento. La nicotina impiegata era pura ($\geq 99\%$) e in forma liquida (Sigma-Aldrich). Da questa è stata preparata una soluzione (Stock Solution) diluendo 16 μ l di nicotina in 984 μ l di PBS. Dalla Stock Solution è stata preparata una soluzione 1000 μ M diluendo 10 di Stock Solution in 990 μ l di terreno di coltura. Da quest'ultima soluzione sono state effettuate delle diluizioni scalari in maniera da raggiungere le concentrazioni di alcaloide richieste per il successivo MTS Assay, un saggio colorimetrico, per la determinazione del numero di cellule vitali proliferanti. Questo è stato condotto per testare diverse concentrazioni di nicotina prima del

trattamento delle cellule. Il saggio sfrutta un sale, il 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H tetrazolium) in associazione ad un reagente di accoppiamento ovvero il PMS (phenazine methosulfate). Il sale viene bioridotto dalle cellule originando, a livello del mezzo di coltura, formazano solubile come prodotto finale. Nello specifico la conversione del sale in formazano, viene operata dalle deidrogenasi presenti nelle cellule metabolicamente attive. Dopo l'incubazione delle cellule con la soluzione MTS/PMS si ha un aumento dell'assorbanza a 490nm che può essere misurata direttamente da una piastra 96-wells. In particolare il saggio effettuato (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega) ha previsto la semina in una piastra da 96wells delle cellule hAFSCs (100 ul/well ~3000 cells), dopo 24 h di incubazione a 37°C al 5% CO₂, le cellule in questione hanno aderito al fondo dei pozzetti della piastra da 96-wells. Quindi è stato valutato l'effetto delle seguenti concentrazioni di nicotina 0.01 uM, 0.1 uM, 1 uM e 10 uM dopo 24, 48 e 72 ore. Dopo ogni trattamento è stato aggiunto ad ogni pozzetto un volume di 20 ul di CellTiter One Solution Reagent (Promega), quindi la piastra è stata nuovamente posta in incubatore per 2 ore e trascorso questo periodo di tempo valutata l'assorbanza a 490 nm (TOUCH™ Automatic ELISA Plate Analyzer, Robonik). L'assorbanza misurata è stata "normalizzata" attraverso la misurazione dell'assorbanza nei pozzetti che

contenevano solamente IMDM e la successiva sottrazione di questa dai valori effettivamente misurati. Da queste misurazioni è stata generata una curva dose-risposta che ha consentito di correlare l'assorbanza alla concentrazione inibente (IC₅₀) ovvero alla concentrazione di nicotina alla quale il 50% delle cellule non mostrava vitalità e quindi di individuare la concentrazione da utilizzare nei successivi trattamenti.

3.3. Differenziamento adipogenico e colorazione Oil Red O

Al 5° passaggio e ad una confluenza di circa il 90%, ogni linea (campione) è stata trattata come segue:

- terreno adipogenico per favorire il differenziamento delle cellule staminali;
- terreno adipogenico e nicotina 0.1 uM;
- nessun trattamento, solo terreno IMDM con citochina.

Il terreno adipogenico utilizzato (AdipoMAX Differentiation Medium, Sigma-Aldrich) è un terreno arricchito con un supplemento specifico (dilution factor) per favorire il differenziamento, tale terreno è stato sostituito al terreno IMDM.

Il differenziamento ha previsto un cambio terreno due volte a settimana per un totale di 21 giorni. Dopo 21 giorni si è proceduto con la colorazione differenziale delle cellule per evidenziare i lipidi neutri eventualmente presenti.

Nello specifico la colorazione utilizzata è stata quella dell'Oil Red O in soluzione allo 0.5% di isopropanolo (Sigma-Aldrich). Si tratta di una

colorazione istofisica in quanto si basa sulla proprietà fisica che hanno i coloranti lisocromi di essere più solubili nei lipidi che nell'alcool a bassa concentrazione, in cui tali coloranti sono disciolti; tale proprietà consente di evidenziare gli eventuali vacuoli lipidici intracellulari ("fat droplets"). Dopo aver rimosso il terreno, le hAFSCs sono state lavate due volte con il PBS. Successivamente sono state fissate in paraformaldeide al 4% in PBS per 30', rimossa la paraformaldeide sono state trattate con isopropanolo al 60% (Carlo Erba) per 5', una volta scartato, colorate con la soluzione di Oil Red O e incubate per 10'. Dopo l'incubazione, le cellule sono state lavate quattro volte per rimuovere gli eccessi di colorante. Quindi è stata aggiunta ematosilina, un colorante in grado di legarsi a molecole basofile, e incubata per 1', successivamente è stato effettuato un lavaggio con acqua di fonte. Le cellule sono state poi osservate al microscopio ottico al 20X e al 40X.

3.4. Estrazione degli acidi nucleici

Il medium è stato rimosso, dopo il lavaggio con il PBS le cellule sono state staccate utilizzando tripsina in EDTA allo 0.05% e incubando per 5' a 37°C. Dopo aver verificato il distacco delle cellule al microscopio, è stata bloccata l'azione della tripsina aggiungendo terreno in misura doppia rispetto l'enzima utilizzato; quindi le cellule in sospensione sono state trasferite in una falcon e centrifugate a 1800 rpm per 5'. Rimosso il surnatante, è stato effettuato un

lavaggio ulteriore del pellet con 1 ml di PBS e successiva centrifugazione a 2500 rpm per 5'.

3.4.1. Estrazione del DNA

Rimosso il surnatante, il pellet è stato preparato per l'estrazione mediante l'estrattore automatico MagPurix 12S extractor (Cod. ZP01001, MagPurix®, Zinexts Life Science), usando lo specifico MagPurix Forensic DNA Extraction Kit 200 (Cod. ZP02010-48, MagPurix®, Zinexts Life Science). La tecnica di isolamento sfrutta la separazione degli acidi nucleici mediante l'ausilio di microbiglie magnetiche e prevede il susseguirsi di quattro fasi fondamentali: la lisi cellulare, il legame degli acidi nucleici, i lavaggi e l'eluizione finale (Fig. 8). Le biglie magnetiche e i reagenti per l'estrazione e la purificazione (Binding Buffer, Washing Buffer e Elution Buffer) si trovano all'interno di cartucce monouso pronte all'uso. Una volta avvenuto il legame acido nucleico-biglie magnetiche, viene attivata una piastra magnetica che attira a sé il DNA, mantenendolo sul fondo della camera di reazione, in modo da poter aspirare il surnatante contenente i contaminanti. Successivamente l'acido nucleico viene eluito dalle biglie utilizzando il Buffer di eluizione e risospeso opportunamente per essere utilizzato.

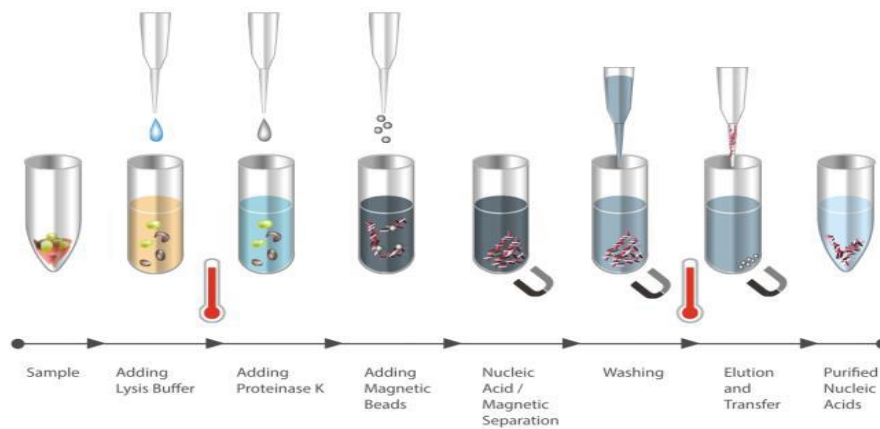


Fig. 8: Fasi dell'estrazione del DNA mediante MagPurix Forensic DNA Extraction Kit 200 (Cod. ZP02010-48, MagPurix®, Zinexts Life Science)

In particolare, il pellet cellulare è stato risospeso in 400ul di Lysis Buffer e 20 ul di proteinase K. Si è proceduto all'incubazione a 56°C per 40' (ThermoMixer, Eppendorf) trascorso questo tempo il lisato è stato centrifugato a 13000 rpm per 2' sfruttando un filtro e l'eluato è stato caricato nello strumento per l'estrazione, impostando come volume di eluizione 50 ul.

3.4.2. Estrazione RNA totale e miRNA

Per l'estrazione dell'RNA totale e dei microRNA, è stato utilizzato il kit Hybrid-R miRNA, (GeneAll). Il pellet ottenuto dalla centrifugazione è stato risospeso in 500 ul di RiboEX (un reagente che va a denaturare le proteine e inattivare le nucleasi sfruttando una miscela sale di guanidina/fenolo).

Dopo aver trasferito il pellet risospeso in una provetta sterile da 1.5 ml, esso è stato centrifugato a freddo (4°C per 10', 12000 rcf). Il surnatante è stato posto

in una nuova provetta da 1.5 ml e sono stati aggiunti 100 ul di cloroformio (EuroClone); la provetta è stata agitata per 15 sec e incubata a temperatura ambiente per 2', successivamente è avvenuta una nuova centrifugazione a freddo (4°C per 15', 12000 rcf). Dopo la centrifugazione si formano 3 diverse fasi: solo la fase superiore acquosa è stata prelevata e trasferita in una nuova provetta. Sono stati aggiunti 750 ul di etanolo 100% (Carlo Erba), la provetta è stata agitata per inversione. Per l'RNA totale, il contenuto della provetta è stato trasferito in una colonnina con filtro contenuta nel kit stesso (Red Ring Column) e sono stati aggiunti nella colonna 500 ul di buffer SW1. La colonna è stata centrifugata a 10000 rcf per 30'' a temperatura ambiente. Sono stati effettuati due lavaggi consecutivi utilizzando 500 ul di buffer RNW nella colonna e centrifugato nuovamente (10000 rcf per 30'', temperatura ambiente). È stato rimosso l'ulteriore buffer gettando l'eluato e centrifugando ancora per 1' nelle stesse condizioni. L'eluizione finale è avvenuta ponendo il filtro in una provetta da 1.5 ml sterile, aggiungendo al centro del filtro 50 ul di H₂O RNase free e centrifugando (10000 rcf, 1', a temperatura ambiente). L'acido nucleico così estratto è stato conservato a -20°C.

Per i miRNA, il protocollo utilizzato ha previsto che dopo la formazione delle tre distinte fasi, la fase superiore acquosa sia stata trasferita in una nuova provetta sterile. Sono stati aggiunti 750 ul di EtOH 100% (Carlo Erba) e la

provetta è stata agitata per inversione. Il contenuto della provetta è stato trasferito in una colonna con filtro fornita dal kit stesso (Blue Ring Column) e sono stati aggiunti 500 ul di EtOH 100% (Carlo Erba) pipettando.

La provetta è stata centrifugata due volte a 12000 rcf, per 1', a temperatura ambiente. Sono stati effettuati due lavaggi con 500 ul di buffer RNW, centrifugando ogni volta nelle stesse modalità descritte. È stato rimosso il buffer rimanente gettando l'eluato e centrifugando ancora per 2' nelle stesse condizioni. L'eluizione finale è avvenuta ponendo il filtro in una provetta da 1.5 ml sterile, aggiungendo al centro del filtro 50 ul di H₂O RNase free e centrifugando (12000 rcf, 1', a temperatura ambiente). L'RNA estratto è stato conservato a -80°C.

3.5. Quantizzazione degli acidi nucleici

La quantizzazione degli acidi nucleici estratti è stata condotta mediante il fluorimetro Qubit 3.0 (Invitrogen, ThermoFisher Scientific), utilizzando per il DNA il kit Qubit™ ssDNA Assay e per l'RNA il kit Qubit™ RNA HS Assay (Invitrogen, ThermoFisher Scientific). Il protocollo prevede la preparazione in una provetta da 1.5 ml sterile, della Qubit working solution costituita da: 199 ul di Qubit Buffer e 1 ul di Qubit Reagent per ogni campione. La Qubit Working Solution è stata vortexata per 3''-5'' e dispensata nelle apposite provette da 0.5 ml (Qubit™ Assay Tubes, Invitrogen), quindi sono stati aggiunti 2 ul di DNA

o RNA per campione. Ogni campione è stato incubato al buio, a temperatura ambiente per 2' ed è quindi avvenuta la lettura della concentrazione inserendo la provetta da 0.5 ml nel fluorimetro.

3.6. Retrotrascrizione e Real Time qPCR

La retrotrascrizione consente di sintetizzare a partire dal mRNA, un DNA a singolo filamento complementare (cDNA) è stata condotta a partire dal mRNA presente nell'RNA totale estratto. La fase di trascrizione inversa richiede un primer (oligonucleotide) per iniziare la reazione di polimerizzazione ed un enzima specifico: la trascrittasi inversa (Strachan T and Read A, 2016). Per condurre la reazione è stato utilizzato il RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit (ThermoFisher Scientific): la mix è stata preparata in ghiaccio, utilizzando 1 ng di RNA, 1 ul di Oligo(dT) [100 uM] e H₂O nuclease free, fino al volume finale di 12 ul. La mix è stata vortexata e centrifugata brevemente, quindi incubata a 65° C nel termociclature SimplyAmp™ (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific). In ghiaccio sono stati dispensati nella provetta incubata i seguenti reagenti: 4 ul di 5X Reaction Buffer, 1 ul di RiboLock RNase Inhibitor, 2 ul dNTPs mix e 1 ul di enzima RevertAid M-MuLV Retrotrascrittase (volume finale 20 ul). La provetta è stata quindi brevemente vortexata e spinnata, quindi incubata nel termociclature

SimplyAmp™ (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific) a 45°C per 60' e a 70°C per 5'.

La Real Time-qPCR è una tecnica che si basa sull'identificazione e sulla quantificazione in tempo reale della fluorescenza emessa da una molecola reporter. Questo avviene durante la fase di accumulo del prodotto di PCR e ad ogni ciclo di amplificazione, consentendo così di monitorare l'amplificazione durante la fase iniziale e soprattutto durante la fase esponenziale della reazione di PCR. Per la Real Time-qPCR è stata preparata una mix che comprendeva per ogni campione: 6.8 ul di H₂O nuclease free, 10 ul di 2X MasterMix (SYBR™ Green Fast Advanced Cells-to-CT™ Kit Invitrogen, ThermoFisher Scientific), 0.6 ul di primer forward [100 pmol/ul], 0.6 ul di primer reverse [100 pmol/ul] e 2 ul (~5ng/ul) di cDNA. Sono stati utilizzati dei primers “highly purified salt-free” (Eurofins Genomics) per tutti i target e per il gene scelto come reference, GAPDH; le sequenze dei primers utilizzati sono riportate nella tabella seguente:

#	Gene	Forward Primer (5' -> 3')		Reverse Primer (5' -> 3')	
		Sequence	-mer	Sequence	-mer
1	C-KIT	CCACACCCTGTTCACTCCTT	20	TTCTGGGAAACTCCCAT TTG	20
2	Oct-4	CTTGCTGCAGAAGTGGGTGGAGGAA	25	CTGCAGTGTGGGTTTCGGGCA	21
3	Sox-2	TTGCTGCCTCTTTAAGACTAGGA	23	CTGGGGCTCAAACCTTCTCTC	20
4	Klf-4	AAGCCAAAGAGGGGAAGACG	20	CATGTGTAAGGCGAGGTGGT	20
5	LPL	CTC TTG GGA TAC AGC CTT GG	20	GGG GCT TCT GCA TAC TCAAA	20
6	PPARG	CCA GAA AGC GAT TCC TTC AC	20	GAG AGA TCC ACG GAG CTG AT	20
7	FABP4	AAC CTT AGA TGG GGG TGT CC	20	GTG GAA GTG ACG CCT TTC AT	20
8	GAPDH (Reference gene)	ACCATCTTCCAGGAGCGAGA	20	AGTGATGGCATGGACTGTGG	20

La reazione è stata condotta in piastre da 96-well e i campioni sono stati analizzati in duplicato, effettuando anche un controllo negativo di reazione. Dispensata la mix, la piastra è stata caricata sullo strumento QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific) utilizzando il seguente protocollo di amplificazione:

STEP	TEMPERATURE	TIME	NO. OF CYCLES
UDG pre-treatment	50° C	2 minutes	1
Initial denaturation	95° C	10 minutes	1
Denaturation	95° C	15 seconds	40 cycles
Annealing and Extension (*data acquisition)	60° C (example)	30 seconds	
Denaturation for melt curve	95° C	15 sec	1
Annealing and extension	60	1 min	
(*data acquisition)	95	15 sec	
Dissociation for melt curve			

3.7. Immunofenotipizzazione mediante citometria a flusso

La citometria a flusso è una tecnica che consente di discriminare le cellule sulla base della diffusione della luce e della fluorescenza rilevata utilizzando specifici Ab coniugati con fluorocromi che riconoscono antigeni (Ag) sulla superficie della cellula stessa. Gli Ab primari anti-human coniugati e non utilizzati sono elencati nella tabella sottostante:

Antibodies used	Manufacturer
Primary Conjugated	
Anti-human CD13-FITC	<u>Ancell</u> (MN, USA)
Anti-human CD44-FITC	
Anti-human CD45-FITC	
Anti-human CD29-PE	
Anti-human CD105-FITC	
Anti-human CD166-FITC	
Anti-human CD14-FITC	
Anti-human HLA-DR-PE	
Anti-human HLA-ABC- Alexa488	
Anti-human CD90-FITC	
Anti-human CD73-PE	<u>Miltenvi Biotec</u> (Bergisch Gladbach, Germany);
Anti-human SSEA4-FITC	
Anti-human CD117-APC	Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
Anti-human CD144-FITC	<u>Acris Antibodies</u> (Herford, Germany)
Anti-human CD34-PE	Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA)
Primary Unconjugated	
Mouse anti-human NANOG	<u>ThermoFisher Scientific</u> (MA, USA)
Mouse anti-human Sox2	
Rabbit anti-human OCT-4	
Secondary Conjugated antibodies to bind against primary unconjugated	
Alexa Fluor® 488 conjugated goat anti-mouse IgG	<u>ThermoFisher Scientific</u> (MA, USA)
Alexa Fluor® 532 conjugated goat anti-Rabbit IgG (H+L)	

Le hAFSCs sono state marcate con gli Ab primari anti-human: sono state incubate con 100 ul di EDTA 20mM a 37°C per 10', quindi è stato effettuato un lavaggio in Wash Buffer (PBS, 0.1% di sodio azide, 0.5% di albumina sierica bovina; sono stati usati 3 ml seguiti da centrifugazione a 400 rcf per 8', 4°C, per ogni lavaggio del protocollo). Per marcare i target intracellulari con gli Ab specifici è stato necessario aumentare la permeabilità delle cellule: è stato aggiunto il reagente Perm2 (BD Biosciences, Becton Dickinson and Company), vortexato brevemente ed incubato per 10' a temperatura ambiente, al buio. I campioni sono stati risospesi in 100 ul di Wash Buffer, contenente Ab primario ed è seguita un'incubazione di 30' a 4°, al buio. Le cellule sono state risospese in Wash Buffer contenente l'Ab secondario marcato con il fluoroforo e incubate nelle stesse condizioni. Dopo un ulteriore lavaggio in Wash Buffer,

le hAFSCs sono state fissate in 1 ml di paraformaldeide allo 0.05%, incubando 5' a temperatura ambiente. Infine è stato effettuato un ultimo lavaggio in Wash Buffer e sono state risospese nello stesso Buffer. Così marcate, le cellule sono state analizzate utilizzando il FACSCanto Flow Cytometer (BD Biosciences, Becton Dickinson and Company) e il software FacDiva v6.1.3. (BD Biosciences, Becton Dickinson and Company). I detriti sono stati esclusi dall'analisi considerando i parametri morfologici (sono stati osservati 20,000 eventi per ogni campione). I dati sono stati analizzati utilizzando il software FlowJo™ (TreeStar). Il rapporto di intensità di fluorescenza media (ratio MFI) è stato calcolato dividendo il MFI degli eventi positivi per il MFI degli eventi negativi.

3.8. Analisi dello stato di metilazione

3.8.1. Metilazione Globale del DNA

La metilazione globale del DNA a livello della 5-mC è stata determinata utilizzando un test colorimetrico di tipo ELISA (MethylFlash Methylated DNA Quantification Kit). Sono stati utilizzati 100 ng di DNA, che sono stati dispensati all'interno di una piastra fornita dal kit stesso assieme a 80 ul/well di Binding Solution, dopo l'incubazione a 37°C per 90', è stato utilizzato un anticorpo (Ab) di cattura primario in grado di legarsi al DNA metilato (60' a temperatura ambiente) (50 ul).

Sono stati effettuati tre lavaggi utilizzando 150 ul di Wash Buffer fornito dal kit, quindi sono stati dispensati e incubati 50 ul di Ab secondario (“detection antibody”) per 30’ a temperatura ambiente ed effettuati nuovamente quattro lavaggi con 150 ul Wash Buffer. La rilevazione della reazione antigene-anticorpo è avvenuta utilizzando 50 ul di Enancher Solution (30’ a temperatura ambiente).

Sono stati effettuati 5 lavaggi con 150 ul di Wash Buffer. Quindi l’utilizzo di 100 ul di Developer Solution ha permesso il viraggio di colore al blu (10’ a temperatura ambiente, al buio), in presenza di DNA metilato ed infine la reazione è stata bloccata utilizzando 100 ul di Stop Solution. Dopo ~ 15’ è stata valutata l’assorbanza a 450 nm (TOUCH™ Automatic ELISA Plate Analyzer, Robonik). È stato quindi espresso il grado di metilazione in %, attraverso le formule: $5\text{-mC}(\text{ng}) = [(\text{OD campione} - \text{ctrl neg OD}) / \text{slope} \times 2]$ e $[(5\text{-mC ng} / \text{ng DNA input}) * 100]$, (OD=densità ottica misurata). L’assorbanza misurata è stata “normalizzata” attraverso la misurazione dell’assorbanza nei pozzetti che non contenevano DNA e la successiva sottrazione di questa dai valori effettivamente misurati, quindi è stata associata ad un valore corrispondente alla quantità; tutte le misurazioni sono state effettuate in doppio.

3.8.2. Metilazione dell’RNA

La metilazione dell’RNA a livello dell’N6-metiladenosina è stata determinata utilizzando un test colorimetrico ELISA (EpiQuik m⁶A RNA Methylation

Quantification kit, Epigentek Group inc.) che ha previsto l'utilizzo di ~200 ng di RNA estratto. Questi sono stati dispensati all'interno di una piastra fornita dal kit stesso assieme a 80 ul/well di Binding Solution, la piastra è stata coperta con la specifica pellicola ed incubata a 37°C per 90'. È stato utilizzato un anticorpo (Ab) di cattura primario in grado di legarsi all'acido nucleico metilato (60' a temperatura ambiente) (50 ul). Sono stati effettuati tre lavaggi utilizzando 150 ul di Wash Buffer fornito dal kit, quindi sono stati dispensati e incubati 50 ul di Ab secondario ("detection antibody") per 30' a temperatura ambiente ed eseguiti quattro lavaggi con 150 ul Wash Buffer. La rilevazione della reazione antigene-anticorpo è avvenuta utilizzando 50 ul di Enancher Solution (30' a temperatura ambiente). Sono stati effettuati 5 lavaggi con 150 ul di Wash Buffer. Sono stati utilizzati 100 ul di Developer Solution per consentire il viraggio di colore al blu (10' a temperatura ambiente, al buio), in presenza di RNA metilato ed infine la reazione è stata bloccata utilizzando 100 ul di Stop Solution fornita. Dopo ~ 15' è stata valutata l'assorbanza a 450 nm (TOUCH™ Automatic ELISA Plate Analyzer, Robonik). È stata poi espressa la % di m⁶A nell'RNA totale usando le seguenti formule: $m^6A(ng) = [(OD \text{ campione} - OD \text{ ctrl negativo}) / \text{slope}] \times [(m^6A \text{ ng} / \text{ng RNA input}) \times 100]$. L'assorbanza misurata è stata "normalizzata" attraverso la misurazione dell'assorbanza nei pozzetti che non contenevano RNA e la successiva

sottrazione di questa dai valori effettivamente misurati; tutte le misurazioni sono state effettuate in doppio.

3.9. Analisi del profilo di espressione dei miRNA mediante NGS

È stato applicato il sequenziamento NGS per analizzare il profilo di espressione dei microRNA, ottenendo una serie di dati che caratterizzano questo profilo sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo. Il protocollo è basato sulla tecnologia Ion Torrent che prevede l'utilizzo di semiconduttori presenti nei supporti (Ion Chip) in cui viene dispensato il campione durante i cicli di sequenziamento e una rilevazione del segnale che, non sfrutta reazioni luminescenti, ma è basata sulla rilevazione di variazioni di potenziale, derivanti da un cambiamento di pH.

3.9.1. Preparazione delle librerie per “Small RNA”

La tecnologia Ion Torrent per costruire librerie per “Small RNAs” impiega la metodica Ligase-Enhanced Genome Detection (LEGenD), la quale sfrutta l'enzima ligase per legare gli Adattatori ai miRNA presenti nel campione e consentire il successivo sequenziamento degli stessi nella fase successiva, sequenziamento che avviene sempre a partire dall'estremità 5'. La popolazione di miRNA, solamente se legata agli Adattatori verrà retrotrascritta per generare molecole a singolo filamento di cDNA. La preparazione della libreria sfrutta biglie magnetiche e consente la selezione dei miRNA sulla base del peso

molecolare (size in bp), una volta selezionati, verrà allestita una reazione di “Multiplex PCR”, in modo da ottenere l’amplificazione del target di interesse. Dopo l’estrazione dei miRNA, ne è stata valutata la quantità e la qualità sfruttando il fluorimetro Qubit 3.0 (ThermoFisher Scientific) e il Bioanalyzer™ Agilent™ 2100 (l’utilizzo del Bioanalyzer si è reso possibile grazie ad una collaborazione interlaboratorio). La valutazione della qualità è uno step fondamentale della preparazione delle librerie in quanto, secondo il kit in uso, affinché il campione sia processato, è fondamentale che vi sia in esso almeno una quota di miRNA > 0.5% e che l’indice di integrità RIN sia ≥ 7 . In caso contrario il campione deve subire un processo definito “Enrichment” che sfrutta biglie magnetiche. Per la preparazione della libreria è stato utilizzato il kit Ion Total RNA-Seq Kit v2 (ThermoFisher Scientific). Il primo step prevede la preparazione in ghiaccio di una “mix di ibridazione” contenente per campione: 3 ul di Hybridization Solution e 2 ul di Ion Adaptor Mix v2. 5 ul di questa mix sono stati aggiunti a 3 ul di campione (almeno 10 ng di miRNA). Dopo aver vortexato brevemente e spinnato, la reazione, condotta in piastra, è stata caricata nel termociclatore SimplyAmp™ (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific) [65°C per 10’ → 16°C per 5’]. In ghiaccio è stata preparata la “mix di ligazione”, utilizzando per campione: 10 ul di 2X Ligation Buffer e 2 ul di Ligation Enzyme Mix. Vortexata e spinnata, la mix (12 ul) è stata aggiunta ad

ogni campione (volume finale = 20 ul), infine è avvenuta un'incubazione di ~16 ore a 16°C nel termociclatore. Successivamente è stata allestita la mix per la retrotrascrizione, in maniera da convertire l'RNA in cDNA, come segue: 2 ul H₂O Nuclease-free, 4 ul di 10X RT Buffer, 2 ul di dNTPs [2.5 mM] e 8 ul di Ion RT Primer v2 (vol. finale 16 ul). Per incubare la mix con l'RNA ligato, sono stati aggiunti direttamente in piastra 16 ul della stessa, quindi la piastra è stata posta nel termociclatore a 70° C per 10', raffreddata subito in ghiaccio e poi sono stati aggiunti 4 ul di polimerasi per ogni campione. Dopo aver vortexato e spinnato brevemente la piastra, essa è stata posta nel termociclatore per 30' a 42°C.

Lo step successivo ha previsto la purificazione del cDNA dalle possibili molecole cDNA di grandi dimensioni, utilizzando etanolo e un sistema a biglie magnetiche, in grado di legare l'acido nucleico, che verrà poi eluito in H₂O nuclease free riscaldata a 37°C. Il cDNA è stato quindi amplificato e legato a sequenze oligonucleotidiche definite "barcode" necessarie ad identificare i campioni (Ion Xpress™ RNA-Seq Barcode 01–16 Kit, ThermoFisher Scientific). Quindi è stata allestita una mix di reazione contenente per ogni campione 45 ul di Platinum™ PCR SuperMix High Fidelity e 1 ul di primer Ion Xpress™ RNA 3' Barcode. Sono quindi stati miscelati 6 ul di cDNA e 46

ul di mix, infine è stato aggiunto lo specifico barcode (1 ul) in ogni campione.

Nel termociclatore il protocollo di amplificazione-ligation prevedeva:

Stage	Temp	Time
Hold	94°C	2 minutes
Cycle (2 cycles)	94°C	30 seconds
	50°C	30 seconds
	68°C	30 seconds
	94°C	30 seconds
Cycle (14 cycles)	62°C	30 seconds
	68°C	30 seconds
	94°C	30 seconds
Hold	68°C	5 minutes

Lo step successivo ha previsto una ulteriore purificazione del cDNA, utilizzando EtOH, biglie magnetiche e H₂O a 37°C per l'eluizione finale.

Ancora una volta, al termine della preparazione della libreria, è stato necessario verificare la resa, utilizzando il Bioanalyzer™ Agilent™ 2100. Dalla corsa delle librerie, si otterranno picchi in due aree differenti di un grafico: tra 50-300 bp correranno tutti i campioni in cui la ligation è andata a buon fine, tra 94 e 114 bp correranno solamente i miRNA legati ai barcode. Deve quindi essere calcolata la ratio corrispondente ai miRNA ligati presenti, in relazione a tutti i miRNA legati ai barcode, secondo la formula $[\text{Area (94–114 bp)}] / [\text{Area (50–300 bp)}]$, la ratio deve essere >50%, affinché la qualità della libreria sia molto buona. Alla fine del processo, le librerie devono essere quantizzate, in maniera tale da creare un pool di librerie a cDNA, tutte con la stessa concentrazione, in modo tale da non determinare falsi risultati nelle fasi successive di emulsion PCR e sequenziamento.

3.9.2. Preparazione del template mediante Emulsion-PCR e caricamento sul Chip

L'utilizzo dello strumento Ion Chef System (ThermoFisher Scientific) per la preparazione del template su piattaforma NGS permette la completa automazione e standardizzazione del processo (Fig. 9).



Fig. 9 Ion Chef System, ThermoFisher Scientific

La preparazione del template è avvenuta utilizzando Ion 510 & Ion 520 & Ion 530 Kit – Chef, che consente il successivo sequenziamento sull'Ion S5 Sequencer (ThermoFisher Scientific). Il kit include i reagenti e i materiali consumabili per preparare le Ion Sphere Particles (ISP) con il template e caricarle sul chip Ion 520, ed i reagenti e i materiali per sequenziare i chips caricati, attraverso l'utilizzo di Ion S5 Sequencer. Il primo step ha previsto la diluizione delle librerie quantizzate ad una concentrazione ~100 pM (Dilution Factor = Library or pooled library concentration in pM)/100 pM).

Successivamente è stato sfruttato lo strumento Ion Chef per permettere la realizzazione della “Emulsion PCR” e del caricamento del template sul Chip. La PCR in emulsione è possibile grazie alla miscela di due sostanze insolubili (acqua ed olio): le goccioline di acqua fungono da micro reattori nei quali avverrà la reazione di PCR. La condizione ideale che può presentarsi, prevede la presenza di una sola biglia e un solo tipo di amplicone in ogni micro reattore. In questo modo saremmo di fronte ad una condizione di monoclonalità che è teoricamente la migliore ma impossibile da verificarsi nella realtà. Ci saranno infatti dei micro reattori che conterranno più ampliconi che legheranno una stessa biglia (condizione di policlonalità). Addirittura può presentarsi la condizione in cui nei micro reattori siano presenti solo ampliconi o solo biglie. Per ovviare a questi problemi, saranno sfruttate la bio-statistica e la bio-informatica nella fase di analisi del dato: specifici algoritmi saranno in grado di filtrare i risultati ottenuti, limitando al massimo la possibilità di errore. Il filtro permetterà infatti la lettura esclusivamente delle reazioni monoclonali, rendendo i dati ottenuti attendibili. Una volta avvenuta la PCR in emulsione il sistema tramite il processo di “Enrichment” seleziona solamente le sfere su cui ciascun amplicone si sarà legato e amplificato. Questa selezione avviene tramite l’utilizzo di biglie magnetiche di streptavidina che hanno affinità per le estremità biotinilate degli ampliconi. Una fase di denaturazione che avviene

tramite un lavaggio con NaOH provvede a staccare le biglie di streptavidina dalle ISP amplificate. Infine il sistema procede al caricamento del Chip posizionando una singola sfera (che nella condizione ideale lega un solo amplicone, ulteriormente amplificato nella Emulsion PCR) in ogni micro pozzetto di un chip.

3.9.3. Sequenziamento del Chip

Il sequenziamento è avvenuto mediante lo strumento Ion S5 System (Fig. 10).

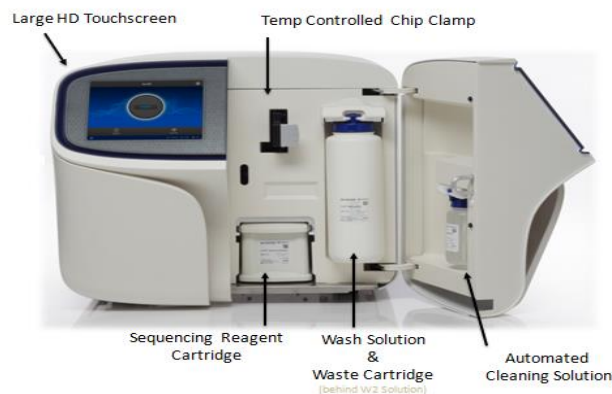


Fig. 10: Ion S5 System e relative reagenti/alloggiamenti

In una prima fase detta inizializzazione, lo strumento Ion S5 automaticamente effettua dei lavaggi per la pulizia delle condutture interne e porta a pH ottimale (7.75) le soluzioni che intervengono nel sequenziamento, pertanto, solamente quando sullo strumento appare l'apposito comando, occorre rimuovere la "S5 wash solution bottle" e svuotare il "waste reservoir" retrostante la bottiglia. A questo punto occorre ricollocare il waste reservoir vuoto nell'apposito scompartimento. Ad ogni inizializzazione bisogna sostituire la cartuccia "Ion

S5 Sequencing Reagents” e la soluzione di lavaggio “Ion S5 Wash Solution Bottle” utilizzate con quelle nuove, ricordandosi di invertire quest’ultima almeno 5 volte, assicurandosi che sia ben miscelata, prima di installarla nello strumento. È necessario inoltre assicurarsi che ci sia un chip esausto nell’alloggio apposito. Una volta effettuati tutti questi accorgimenti, lo strumento è pronto per l’inizializzazione. Questa procedura impiega circa 50 minuti ed al suo termine è possibile effettuare una corsa di sequenziamento. Prima di avviare l’Ion Chef System è importante impostare tutti i parametri necessari alla successiva corsa su Ion S5 mediante il software Torrent Suite™ (ThermoFisher Scientific) accessibile come server online. Una volta che “Ion Chef System” ha ultimato il caricamento del Chip, quest’ultimo è stato inserito nel sequenziatore. La corsa di sequenziamento impiegherà circa 2 ore.

3.9.4. Analisi dei dati di NGS

Tutti i dati ottenuti sono stati analizzati mediante il software Torrent Suite™ ed il suo plug-in RNAseq: RNAseq Analysis prevede un report in cui viene valutata la bontà dei dati generati dal sequenziamento. Le sequenze sono state pre-processate con il processo di “trimming” in maniera da “tagliare” le sequenze degli adattatori e facilitare l’allineamento delle reads; viene settato dal software un cut-off per la lunghezza minima e massima delle reads ottenute

(17 nt-35 nt). Le reads (FASTQ files) sono state mappate (software SHRiMP2) utilizzando sia sequenze di riferimento (tRNA, rRNA e pre-miRNA) derivanti da database di RNA che le sequenze degli adattatori utilizzati. I dati ricavati dal processo di allineamento in formato SAM (Sequence Allineamento/Map) possono essere salvati oltre che in formato FASTQ anche in formato BAM (Binary sequence Alignment Map) che funge da controparte binaria e compressa di codifica del formato standard di riferimento. Grazie al SAM file è possibile definire il numero di reads mappate (processo di “counting”), individuando per ogni tRNA, rRNA e miRNA il numero delle stesse reads. Le reads sono state calcolate dal file di output, determinando il numero di volte in cui si ripetevano per ogni trascritto. Il processo di “counting” ha subito un processo di normalizzazione con un algoritmo (DESeq2) in grado di minimizzare la variabilità derivante dalle reads meno espresse.

Infine tramite un apposito algoritmo è stato generato un report statistico dei miRNA individuati. Il profiling dei miRNA ha consentito di individuarne 1020, è stato fissato un cut-off consentendo di suddividerli in tre gruppi: miRNA >10000 reads rappresentano quelli ad alta espressione (very highly expressed), 9999-1000 reads sono quelli moderatamente espressi (moderately expressed), 999-100 reads sono quelli scarsamente espressi (low expressed).

3.10. Analisi statistica

Per ognuno dei 5 campioni (replicati biologici) è stato effettuato un duplicato tecnico in relazione al tipo di esperimento effettuato e presa in considerazione la media per l'interpretazione dei dati. Le medie sono quindi state utilizzate per i calcoli con Graph Pad Prism V6 ed è stata determinata la significatività statistica con test t-Student senza effettuare correzioni per comparazioni multiple. I dati sono stati espressi in termini di \pm SD. I p-value sono stati espressi come **** quando $p < 0.0001$, *** quando $p < 0.001$, ** quando $p < 0.01$ e * quando $p < 0.05$.

Capitolo IV

RISULTATI

4.1. Effetto della nicotina sulla proliferazione cellulare

Il trattamento con la nicotina effettuato sulle hAFSCs ha mostrato come queste cellule reagiscano in maniera differente alle diverse concentrazioni di nicotina testate con il saggio MTS. Concentrazioni di nicotina pari a 10 uM, risultano essere molto tossiche per le cellule, 0.1 uM di nicotina, causano una diminuzione di ~50% delle cellule dopo il trattamento, pertanto pur essendo molto bassa è stata scelta questa concentrazione come quella da usare nel trattamento. Va inoltre esplicitato che le hAFSCs mostrano lo stesso trend nell'effetto dovuto a diverse concentrazioni di trattamento e simile % di vitalità nei diversi intervalli di tempo in relazione alle diverse concentrazioni di nicotina.

4.2. Effetto della nicotina sulle cellule staminali non differenziate

4.2.1. Metilazione globale del DNA e metilazione dell'RNA nelle hAFSCs

Le hAFSCs, rispetto al controllo non trattato con nicotina, mostrano un incremento nei livelli di metilazione globale a livello della 5-mC. Il controllo ha mostrato lo stesso livello di metilazione dopo 6, 24 e 48h di trattamento. Al

contrario è stato osservato un aumento della metilazione nelle cellule trattate non differenziate, anche in relazione al tempo: dopo 48 h di trattamento l'incremento risultava essere del $2.08 \pm 0.09\%$ rispetto al controllo non trattato. Dopo 6 h l'incremento era pari a $1.43 \pm 0.85\%$ e dopo 24 h, $1.74 \pm 0.15\%$ (Fig. 11).

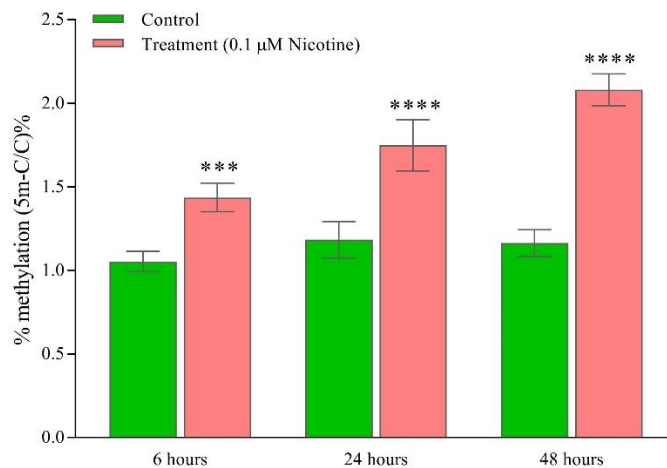


Fig. 11 Livelli di metilazione globale del DNA nelle cellule hAFSCs. (*** $P \leq 0.001$ e **** $P \leq 0.0001$)

Per quanto riguarda l'RNA, dopo 6, 24 e 48h di trattamento con nicotina è stata riscontrata una percentuale di metilazione media, pari allo $0.19 \pm 0.003\%$. Non è stata trovata una correlazione effettiva tra la lunghezza del trattamento e il cambiamento nello stato di metilazione della Adenosina, tuttavia come mostrato nella Fig. 12, va evidenziato come già dopo 6 h di trattamento con nicotina 0.1 μM è possibile riscontrare rispetto al controllo una variazione minima ($0.21 \pm 0.004\%$), anche se significativa.

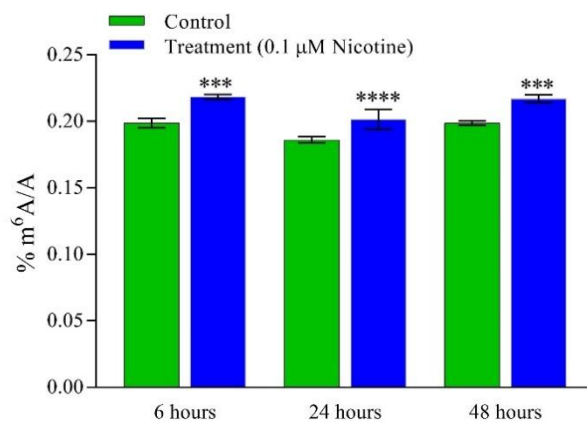


Fig. 12 Cambiamenti nella % di m⁶A metilata dopo 6, 24 e 48 h di trattamento delle hAFSCs. (***) P ≤ 0.001 e **** P ≤ 0.0001)

4.2.2. Espressione dei markers di pluripotenza

I risultati ottenuti dalla Real Time qPCR effettuata dopo il trattamento delle cellule staminali da liquido amniotico non differenziate mostrano un incremento nell'espressione relativa dei markers di pluripotenza Oct-4, SOX2 e KLF4 rispetto al controllo. È emersa una variabilità tra i campioni tuttavia i dati sono concordanti per tutti e tre i markers, ma prima di 48h di trattamento sembrerebbero non esserci variazioni significative (in particolare per KLF4). Tuttavia per c-Kit, un altro marker non si osserva nessuna variazione (Fig. 13)

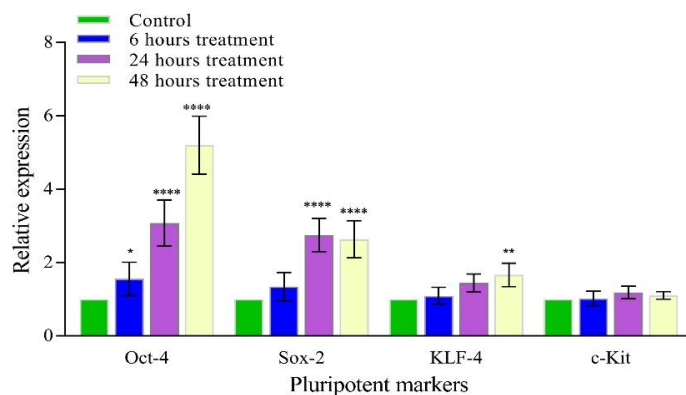


Fig. 13 Variazioni nell'espressione relativa dei markers di staminalità nelle hAFSCs trattate

4.2.3. *Analisi dell'espressione dei markers cellulari mediante citofluorimetria*

Dopo aver trattato le hAFSCs con la nicotina è stata valutata l'espressione delle proteine cellulari attraverso la citofluorimetria. Il rapporto di intensità di fluorescenza media (ratio MFI) è stato calcolato dividendo la ratio MFI degli eventi positivi per quella degli eventi negativi. I risultati sono riportati nella tabella sottostante.

	Control (Mean and SD)		Treatment (Mean and SD)	
CD13	3.9	1.8	17.4	3.8
CD29	63.7	10.1	81.3	12.6
CD44	55.3	11	63.1	11.2
CD73	16.8	6.2	14.7	7.1
CD90	6.5	2.7	3.7	1.1
CD117	1.2	0.2	11.3	1.6
CD146	35.8	12.7	15.7	7.6
CD166	12.8	3.9	12	4.4
CD105	2.2	0.9	2	1.2
CD34	1.1	0.1	1.9	0.2
HLA ABC	45.7	9.9	45.6	9.2
HLA DR	1.2	0.1	1.2	0.1
CD14	1.2	0.2	1.2	0.1
CD144	1.4	0.2	1	0.3
CD45	1.1	0.2	1.5	0.3
NANOG	4.2	1	3.5	0.8
Oct4	3.4	0.2	2.4	0.3
SSEA4	49.6	20	6.3	2.5
Sox2	76	18.3	31.4	10

Le proteine evidenziate sono quelle la cui espressione risulta essere significativamente variata a seguito del trattamento con nicotina. In particolare sembra che CD13, CD44, CD117 e CD34 siano maggiormente espresse, invece, OCT4, SSEA4 e SOX2 lo siano in misura minore ($p \leq 0.001$; controllo vs trattamento). I risultati ottenuti per quanto riguarda SOX2 e Oct4

sembrerebbero essere in contrasto con i risultati di espressione a livello degli mRNA (esperimenti in Real Time), in cui si osservava dopo 48 h di trattamento una maggior espressione dei due geni rispetto al controllo. Tuttavia, ciò potrebbe essere causato dal fatto che l'espressione genica è molto variabile e ogni livello della sua regolazione può essere influenzato da fattori intrinseci ed estrinseci e quindi non sempre è possibile correlare alla espressione del trascritto anche l'espressione a livello della proteina (Liu Y et al., 2016).

4.3. Effetto della nicotina durante il differenziamento adipogenico delle hAFSCs

4.3.1. Valutazione del differenziamento: la colorazione Oil Red O

Dopo aver differenziato le cellule staminali da liquido amniotico per 21 giorni, si è proceduto con l'osservazione delle stesse al microscopio ottico (10X) (Fig. 14)

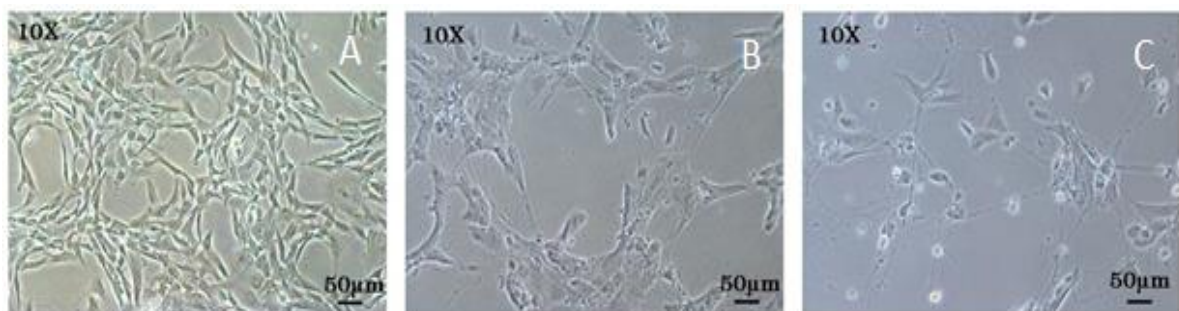


Fig. 14 Immagini al microscopio ottico (ingrandimento 10X): A. cellule hAFS indifferenziate, B. cellule hAFS dopo 21 giorni di differenziamento adipogenico, C. cellule hAFS dopo 21 giorni di differenziamento adipogenico, trattate con nicotina

Dall'osservazione sembrerebbe che il trattamento abbia inibito in parte il differenziamento. A seguito del differenziamento è stata anche effettuata la

colorazione Oil Red O. Si tratta di una colorazione istofisica basata sulla proprietà fisica che hanno i coloranti lisocromi di essere più solubili nei lipidi che nell'alcool a bassa concentrazione, in cui essi sono disciolti; tale proprietà ha consentito di evidenziare vacuoli lipidici intracellulari (“fat droplets”). Rispetto al controllo negativo, in cui sono visibili i nuclei, nelle cellule differenziate, trattate e non con nicotina sono evidenziate in rosso le gocce lipidiche, mentre i nuclei in blu (Fig. 15). Inoltre sebbene il numero di cellule differenziate sembrerebbe essere diminuito a seguito del trattamento con nicotina, la colorazione suggerisce che il pattern di colorazione sia, a prescindere dal trattamento, simile.

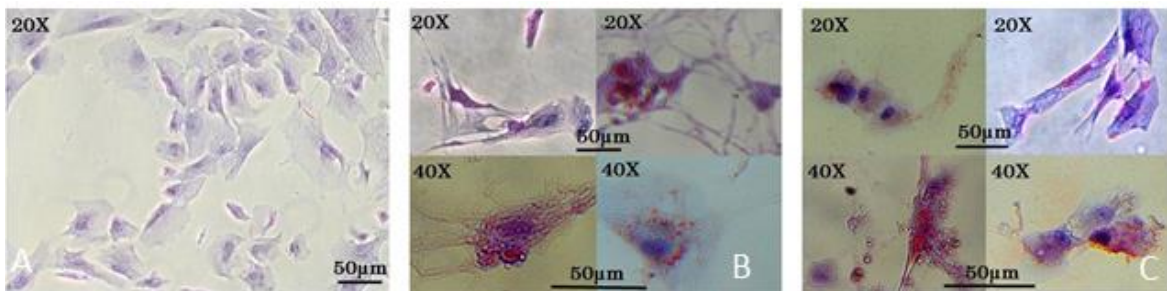


Fig. 15 Colorazione Oil Red O dopo 21 giorni di differenziamento adipogenico: A. ctrl negativo (cellule indifferenziate), B. hAFSCs differenziate, C. hAFSCs differenziate e trattate con nicotina 0.1 μ M.

4.3.2. Espressione dei markers di pluripotenza post-differenziamento

A seguito del trattamento delle cellule con 0,1 μ M di nicotina, è stata eseguita la Real Time qPCR per diversi geni di pluripotenza. Le hAFSCs non differenziate sono state considerate come controllo. I markers di pluripotenza (Oct4, c-Kit, SOX2 e KLF4) presentano una espressione ridotta dopo il

differenziamento ($P \leq 0.0001$; controllo vs cellule differenziate). L'espressione minore è stata osservata per c-Kit (0.19 ± 0.14), a cui fanno seguito SOX2 (0.30 ± 0.07), KLF4 (0.36 ± 0.09) e Oct4 (0.65 ± 0.06) (Fig. 16). Questi dati sembrano correlare positivamente con il processo di differenziamento. Nelle cellule differenziate e trattate con nicotina, l'espressione dei markers di pluripotenza è risultata significativamente inferiore, rispetto a quella delle cellule non trattate, suggerendo l'ipotesi che la nicotina favorisca la downregolazione dei marcatori di pluripotenza. L'espressione è risultata essere inferiore di 0.69 volte per Oct4 ($p \leq 0.01$), 0.13 per c-Kit ($p \leq 0.01$), 0.36 per SOX2 ($p \leq 0.01$) e 0.27 per KLF4 ($P \leq 0.0001$).

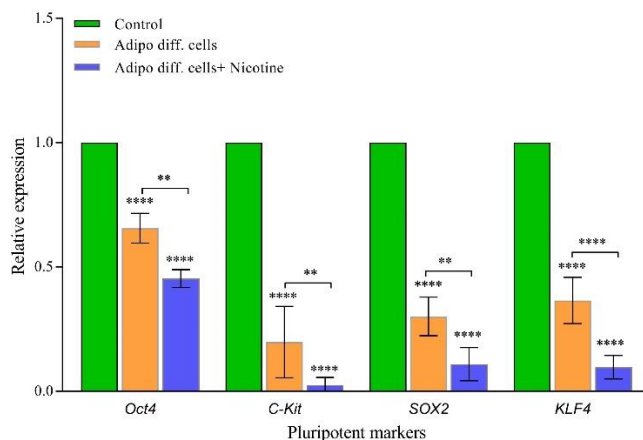


Fig. 16 cambiamenti nell'espressione dei markers di pluripotenza nelle cellule differenziate e in quelle differenziate e trattate con nicotina 0.1 (** $P \leq 0.01$ e **** $P \leq 0.0001$)

4.3.3. Espressione dei markers adipogenici post-differenziamento

È stato valutato l'effetto della nicotina sull'espressione di marcatori espressi a livello adiposo mediante Real Time qPCR. Le cellule differenziate, ma non

trattate sono state utilizzate come controllo. I markers valutati sono stati LPL, PPARG e FABP4. L'espressione di questi marcatori sembrerebbe essere diminuita in maniera significativa a seguito del trattamento con nicotina. LPL risulterebbe essere il meno espresso (0.97 ± 0.071 , $p \leq 0.0001$), seguito da FABP4 (0.202 ± 0.129 , $p \leq 0.0001$) e PPARG (0.331 ± 0.126 , $p \leq 0.0001$) (Fig.17). Questo dato suggerisce che il trattamento con nicotina possa ostacolare il differenziamento cellulare in senso adipogenico.

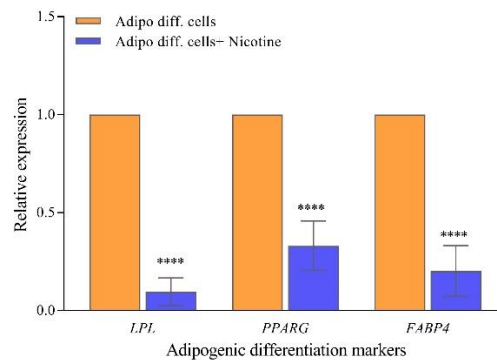


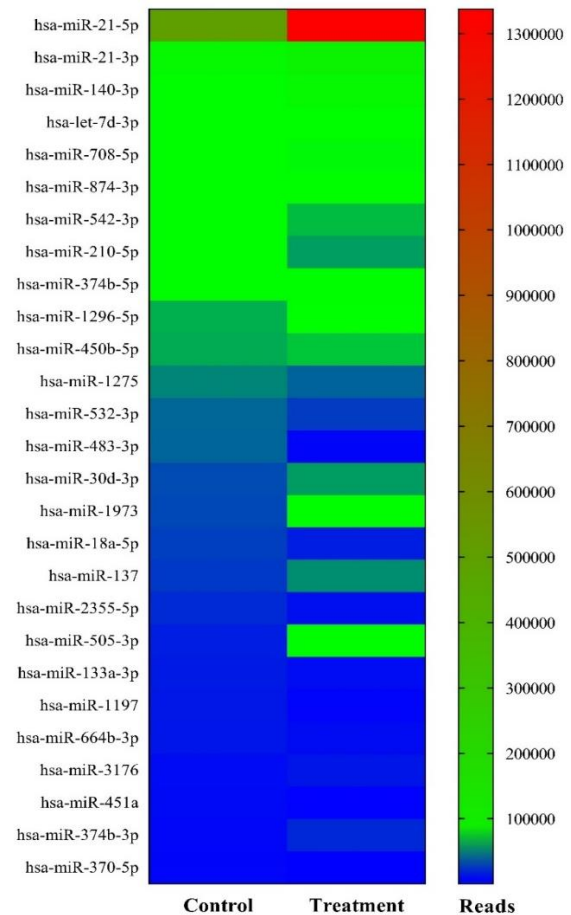
Fig. 17 Risultati relativi all'espressione dei marcatori adipogenici dopo 21 giorni di differenziamento

4.3.4. Analisi del profilo di espressione dei miRNA dopo il trattamento con nicotina

Attraverso il sequenziamento NGS sono stati individuati e quantificati 1020 miRNA, sulla base del controllo di qualità effettuato nell'analisi del dato, di questi ne sono stati presi in considerazione 442. Sono stati suddivisi in tre gruppi: 28 miRNA risultano essere espressi con più di 10000 reads, 64 con un numero di reads compreso tra 9999-1000, 350 miRNA sono quelli debolmente

espressi (999-100 reads). La successiva analisi statistica ha identificato 27 micro RNA, riportati nella successiva tabella, la cui espressione varia in maniera statisticamente significativa, considerando il p-value e il valore di Fold Change (quest'ultimo indica l'intensità di una alterazione rispetto ad un controllo). Affianco la tabella troviamo una "heat map" che ci consente di visualizzare i risultati nell'espressione tra le cellule controllo e quelle trattate.

miRNA	Fold Change	P Value
Upregulated		
hsa-miR-21-5p	2.67	0.0000001
hsa-miR-21-3p	2.19	0.0000495
hsa-miR-140-3p	9.87	0.0000047
hsa-let-7d-3p	1.31	0.0039200
hsa-miR-874-3p	1.40	0.0046760
hsa-miR-374b-5p	3.47	0.0003498
hsa-miR-1296-5p	1.45	0.0346640
hsa-miR-450b-5p	1.16	0.0000110
hsa-miR-30d-3p	2.07	0.0020907
hsa-miR-1973	8.43	0.0004760
hsa-miR-137	2.50	0.0009698
hsa-miR-505-3p	42.10	0.0000081
hsa-miR-3176	1.97	0.0322034
hsa-miR-374b-3p	4.33	0.0117108
Downregulated		
hsa-miR-18a-5p	0.47	0.0312911
hsa-miR-451a	0.29	0.0273571
hsa-miR-664b-3p	0.58	0.0230925
hsa-miR-1275	0.75	0.0149120
hsa-miR-532-3p	0.60	0.0414659
hsa-miR-483-3p	0.08	0.0001089
hsa-miR-133a-3p	0.49	0.0004598
hsa-miR-1197	0.27	0.0188475
hsa-miR-2355-5p	0.39	0.0055298
hsa-miR-542-3p	0.53	0.0493271
hsa-miR-708-5p	0.59	0.0052005
hsa-miR-210-5p	0.57	0.0008906
hsa-miR-370-5p	0.32	0.0070058



Da una prima analisi questi miRNA sembrerebbero essere coinvolti nella staminalità, nel differenziamento e nella proliferazione cellulare.

Capitolo V

DISCUSSIONE

La relazione tra il fumo in gravidanza e gli “outcomes” negativi alla nascita è ben documentata in letteratura (Rogers JM, 2009; Holbrook BD, 2016), nonostante ciò molte donne continuano a sottovalutare i rischi a cui sottopongono loro stesse ed il feto, continuando a fumare, seppur in misura minore (Berlin I et al, 2017). Questo comportamento assunto in gravidanza continua rappresentare un problema da arginare, anche a causa dell’introduzione e diffusione dei nuovi dispositivi in grado di veicolare tabacco (electronic nicotine delivery system “ENDS”) che, pur essendo percepiti come più sicuri, di fatto la loro sicurezza non è stata ancora chiaramente accertata (Breland A et al, 2019). Seppur noto che, la nicotina ha un effetto tossico su madre e feto, diffonde nei compartimenti fetali, concentrandosi a livello del liquido amniotico (Fischer ST et al., 2017), non ancora è stato individuato l’esatto meccanismo attraverso il quale essa agisce. Studi in letteratura ipotizzano che cambiamenti a livello dell’ambiente intrauterino possano causare una mancata regolazione a livello epigenetico (Lock MC et al, 2017), pertanto questo lavoro è finalizzato ad indagare le variazioni a livello epigenetico con particolare attenzione ai microRNA, ancora poco indagati in questo senso, ma che rappresentano uno dei meccanismi in

grado di regolare l'espressione genica. Lo studio è stato effettuato utilizzando come modello cellulare le hAFSCs, un modello in grado di riprodurre *in vitro* quanto avviene a livello fetale (Antonucci I et al., 2016), consentendo di elucidare gli effetti della nicotina, in particolare per quanto riguarda il basso peso alla nascita, una delle più diffuse conseguenze dovute al fumo in gravidanza, associata anche ad effetti sulla salute in età adulta (Knopik SV, 2012). Considerando che in media una singola sigaretta contiene da 0.1 mg a 0.8 mg di nicotina, è stata testata la tossicità della nicotina sulle cellule utilizzate come modello, valutandone l'esposizione a diverse concentrazioni. I risultati derivanti dagli esperimenti effettuati dimostrano come la percentuale di vitalità cellulare sia nulla per cellule trattate con 10 uM di nicotina, invece una concentrazione di 100 volte inferiore provoca una tossicità in grado di causare la diminuzione della vitalità e quindi della proliferazione cellulare, del 50%. 0.01 uM rappresenta quindi la cosiddetta TD50 (Dose Tossica media, in grado di generare tossicità nel 50% dei casi). La tossicità esplicita dalla nicotina e mostrata dai risultati ottenuti, è concordante con quanto presente in letteratura (Guo H et al 2019), dove seppur testando concentrazioni diverse, è stata comunque osservata una diminuita vitalità delle cellule staminali. Poiché questa concentrazione di nicotina corrisponde circa a quella contenuta in una singola sigaretta, essa è stata scelta per tutti gli esperimenti effettuati.

Gli esperimenti effettuati per la valutazione dell'espressione dei markers di pluripotenza (Real Time qPCR) hanno mostrato come per i principali markers di pluripotenza (SOX2, OCT4 e KLF4) si assista ad un aumento dell'espressione a livello del messaggero, che diventa significativo dopo 48 h di trattamento con nicotina. Le cellule quindi sembrerebbero non essere danneggiate nella loro capacità di differenziare nei diversi foglietti embrionali in accordo anche con uno studio di Schaal CM et al. (2018) in cui è stato dimostrato che, nelle cellule staminali mesenchimali, la nicotina può indurre l'espressione di SOX2. Questi risultati sembrano essere in contrasto con i risultati ottenuti dagli esperimenti in citofluorimetria, dai quali emerge invece che a livello della proteina, SOX2, Oct4 e SSEA4 (un altro marker di staminalità), sono downregolati. Ciò potrebbe sembrare contraddittorio, ma in realtà, come riportato in letteratura (Liu Y et al., 2016), può non esserci un rapporto diretto tra mRNA e proteina; come ad esempio nel caso del fattore di trascrizione Gcn4, il cui mRNA risulta costitutivamente espresso ma la cui traduzione viene bloccata in determinate condizioni, da particolari meccanismi o ancora ci potrebbe essere un'espressione "ritardata" della proteina. Quindi, da questi primi esperimenti, si porterebbe ipotizzare un possibile meccanismo di regolazione dell'espressione genica messo in atto dalla nicotina a livello post trascrizionale. Dai risultati degli esperimenti di citofluorimetria risultano

maggiormente espresse proteine come il CD13 o il CD34. Quest'ultimo non è soltanto un marker di fibroblasti, ma la sua presenza assieme a quella del CD13 dimostra che le cellule che esprimono queste proteine sono ancora in grado di differenziare, in particolare in senso adipogenico (Sydney LE et al., 2014).

Le hAFSCs sono state differenziate per 21 giorni in senso adipogenico, come dimostrato anche dai dati di Real Time qPCR in cui si assiste alla ridotta espressione a livello dell'RNA messaggero dei marcatori riferiti alla pluripotenza e alla staminalità (c-Kit, SOX2, Oct4 e KLF4); tuttavia, nelle cellule trattate con nicotina differenziate, l'espressione di questi marcatori è risultata downregolata in misura maggiore, quindi probabilmente l'alcaloide agisce a livello post-trascrizionale nel differenziamento. Al termine dei 21 giorni di differenziamento, è stata valutata l'espressione di marcatori adipogenici: rispetto alle cellule non trattate con nicotina, le staminali da liquido amniotico differenziate, mostrano una ridotta espressione a livello dell'mRNA di LPL, PPAR γ e FABP4. La nicotina può quindi agire a livello dell'espressione di queste proteine fondamentali per il tessuto adiposo. In particolare, LPL è una proteina che trasporta i trigliceridi, necessaria anche nello sviluppo del tessuto adiposo bruno, PPAR γ è coinvolta nello sviluppo del tessuto adiposo e nel metabolismo lipidico e FABP4 promuove l'espressione di PPAR γ e regola l'intake di lipidi nelle cellule (Garcia-Arcos I et al., 2013;

Janani C et al., 2015; Trojnar M et al. 2019). Pertanto la loro ridotta espressione dovuta al trattamento con nicotina può causare effettivamente una disregolazione a livello lipidico e nello sviluppo del tessuto adiposo. Ipotizzando, nello scopo della tesi, un possibile meccanismo epigenetico alla base delle alterazioni provocate sul feto dalla nicotina, in particolare del basso peso alla nascita, è stato valutato il profilo di metilazione considerando sia la metilazione globale del DNA che la metilazione dell'RNA (% di m⁶A). Seppur questi esperimenti siano preliminari, i casi si assiste ad una leggera alterazione del pattern di metilazione del DNA. In letteratura è riportato un aumento nello stato di metilazione del DNA nei fumatori e nella prole di donne fumatrici (Joubert BL et al., 2016; Witt HS et al., 2018). Negli esperimenti effettuati l'aumento % m⁶A è molto lieve; si tratta di un meccanismo epigenetico molto diffuso, il cui ruolo non è ancora esattamente definito, ma ciò che emerge da studi in letteratura (Niu Y et al., 2013) è che una alterazione dei livelli di metilazione possa potenzialmente indurre variazioni in ogni fase della regolazione dell'RNA. Dal momento che la localizzazione delle adenosine metilate incide sull'azione dell'RNA, potrebbe quindi essere interessante cercare di valutare con le nuove tecnologie di NGS dove sono maggiormente localizzate le aree di metilazione dell'RNA dopo il trattamento con nicotina. I miRNA rappresentano un importante meccanismo epigenetico in grado di

regolare l'espressione di molti geni. Lo scopo della tesi era quello di caratterizzare il profilo di espressione dei micro RNA di hAFSCs differenziate in senso adipogenico dopo un trattamento con nicotina. Per la prima volta è stata applicata la tecnologia del Next Generation Sequencing su cellule staminali da liquido amniotico, per provare a studiare l'espressione di questo tipo di non-coding RNA e valutare come essa potesse variare, a livello fetale, in relazione alla nicotina.

I risultati degli esperimenti in NGS mostrano tra i 442 micro RNA espressi, 27 molecole differentemente espresse nelle cellule differenziate trattate, rispetto quelle non trattate. In particolare vi sono nelle cellule trattate 14 miRNA che sembrano essere maggiormente espressi, tra essi mir-21, in grado di controllare il differenziamento in senso adipogenico di cellule mesenchimali e il cui livello è stato correlato al numero di adipociti nel WAT (White Adipose Tissue) (Kim YJ et al., 2012). Tra gli altri miRNA più espressi, anche mir-30d-3p espresso a livello del BAT (Brown Adipose Tissue) e che regola il processo di differenziamento dei cosiddetti "adipociti beige" (Chen Y et al., 2017). Tra i 13 micro RNA meno espressi nelle cellule trattate rispetto al controllo, ci sono anche mir-210 e mir-451. Secondo dati presenti in letteratura (Bavelloni A et al., 2017), se mir-210 viene "downregolato" può inibire la proliferazione cellulare e la sua trascrizione potrebbe essere favorita anche da PPAR γ , che nel

caso dei nostri esperimenti è risultato poco espresso in seguito all'esposizione delle cellule alla nicotina. Anche mir-451 risulta meno espresso a seguito dell'esposizione alla nicotina e sembra coinvolto nel metabolismo degli acidi grassi tramite il controllo dell'espressione di AMPK (AMP-activated protein kinase) (Lock MC et al., 2017). Anche gli altri miRNA oggetto della variazione sembrerebbero coinvolti nei processi di differenziamento e proliferazione, pertanto ciò permette di avvalorare l'ipotesi di un possibile meccanismo epigenetico dovuto all'esposizione, anche minima, alla nicotina.

CAPITOLO VI

CONCLUSIONI

Questo primo approccio di “miRNA profiling” su cellule staminali umane da liquido amniotico ha consentito di identificare una serie di micro RNA la cui espressione è alterata; lo step successivo dovrà essere quello della caratterizzazione dei singoli miRNA e l’identificazione della rete di cui sono parte. Infatti, anche ipotizzando un processo di regolazione a livello post-trascrizionale, la regolazione epigenetica a livello adiposo deve essere meglio compresa e indagata, ricercando con un approccio bioinformatico i target di questi miRNA, in maniera tale da poter individuare il pathway attraverso il quale si verificano, per il feto esposto alla nicotina, i principali effetti negativi tra cui il basso peso alla nascita. Inoltre, dal momento che, anche lo stato metilazione ha mostrato una variazione, potrebbe essere utile andare a valutare, una volta individuati i potenziali bersagli, la metilazione specifica del promotore genico, per quanto riguarda il DNA e per l’RNA la localizzazione delle m⁶A, in maniera da dare il giusto peso ai cambiamenti epigenetici osservati, oltre che fare maggiormente luce sulla totalità e sulla relazione tra i meccanismi epigenetici correlati alla nicotina.

Va precisato che, i risultati ottenuti sono del tutto preliminari, pertanto il lavoro fin qui esposto proseguirà per cercare di superare le limitazioni dovute alla

scarsa numerosità campionaria e alla mancanza di validazione dei risultati ottenuti. Nonostante ciò e ricordando che, la risposta epigenetica al fumo è comunque un processo tessuto-specifico, correlato anche alla frequenza di esposizione e all'età, i risultati mostrati sembrano rappresentare un tassello importante nella comprensione del complesso quadro delle modifiche epigenetiche indotte dall'esposizione fetale al fumo, evidenziando che, anche basse concentrazioni di nicotina, corrispondenti ad una sola sigaretta o all'esposizione al fumo passivo, possono provocare alterazioni significative.

Bibliografia

- Antonucci I et al. “Amniotic Fluid Stem Cells: a novel source for modeling of human genetics diseases”. *International Journal of Molecular Sciences*. (2016). doi:10.3390/ijms17040607
- Antonucci I et al. “Human Second Trimester Amniotic Fluid Cells Are Able to Create Embryoid Body-Like Structures in Vitro and to Show Typical Expression Profiles of Embryonic and Primordial Germ Cells.” *Cell Transplantation* (2014) 23(12):1501–1515. doi:10.3727/096368914X678553.
- Bavelloni A et al. “MiRNA-210: A Current Overview”. *Anticancer Research* (2017). 37:6511-6521. doi:10.21873/anticancer.12107
- Benowitz NL et al. “Cigarette smoking and cardiovascular disease: pathophysiology and implications for treatment”. *Progress in Cardiovascular Diseases* (2003) 46(1):91-111 doi: 10.1016/s0033-0620(03)00087-2
- Bentwich I et al. “Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs”. *Nature Genetics*. (2005) 37(7):766-70. doi: 10.1038/ng1590
- Berlin I et al. “Cigarette Smoking During Pregnancy: Do Complete Abstinence and Low Level Cigarette Smoking Have Similar Impact on Birth Weight?.” *Nicotine & tobacco research: official journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco* (2017) 19(5): 518-524. doi:10.1093/ntr/ntx033
- Bollati V and Baccarelli A. “Environmental epigenetics.” *Heredity* (2010) 105(1): 105-12. doi:10.1038/hdy.2010.2
- Breland A et al. “Electronic nicotine delivery systems and pregnancy: Recent research on perceptions, cessation, and toxicant delivery”. *Birth Defects Research* (2019) doi: 10.1002/bdr2.1561.
- Breton CV et al. “Prenatal tobacco smoke exposure affects global and gene-specific DNA methylation.” *American journal of respiratory and critical care medicine* (2009) 180(5): 462-7. doi:10.1164/rccm.200901-0135OC.

- Chen Y et al. “Regulation of brown and beige fat by microRNAs”. *Pharmacology & Therapeutics* (2017) 170:1–7. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.10.004
- Di Tizio D et al. “The Impact of Epigenetic Signatures on Amniotic Fluid Stem Cell Fate.” *Stem cells international* (2018). doi:10.1155/2018/4274518
- Drake P et al. “Cigarette Smoking During Pregnancy: United States, 2016”. NCHS Data Brief No. 305 (2018)
- Eulalio A et al. “Getting to the Root of miRNA-Mediated Gene Silencing”. *Cell*. (2008) 132. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.024
- Fan, Jie et al. “Effects of prenatal and lactation nicotine exposure on glucose homeostasis, lipogenesis and lipid metabolic profiles in mothers and offspring.” *Toxicology research* (2016) 5:5 1318-1328. doi:10.1039/c6tx00237d
- Fischer ST et al, “Low-level maternal exposure to nicotine associates with significant metabolic perturbations in second-trimester amniotic fluid”. *Environment International* (2017) 107:227–234. doi: 10.1016/j.envint.2017.07.019
- Florescu A et al. “Methods for quantification of exposure to cigarette smoking and environmental tobacco smoke: focus on developmental toxicology.” *Therapeutic drug monitoring* (2009) 31(1): 14-30. doi:10.1097/FTD.0b013e3181957a3b
- Garcia-Arcos I et al. “Adipose-specific lipoprotein lipase deficiency more profoundly affects brown than white fat biology.” *The Journal of biological chemistry* (2013) 288(20): 14046-58. doi:10.1074/jbc.M113.469270
- Gibbs K et al. “Impact of Tobacco Smoke and Nicotine Exposure on Lung Development.” *Chest* (2016) 149(2): 552-561. doi:10.1378/chest.15-1858
- Guo H et al. “Single-Cell RNA Sequencing of Human Embryonic Stem Cell Differentiation Delineates Adverse Effects of Nicotine on Embryonic Development.” *Stem cell reports* (2019) 12(4): 772-786. doi:10.1016/j.stemcr.2019.01.022
- Hackshaw A et al. “Maternal smoking in pregnancy and birth defects: a systematic review based on 173 687 malformed cases and 11.7 million controls.” *Human reproduction update* (2011) 17(5): 589-604. doi:10.1093/humupd/dmr022

- Hawkins KE et al. “Human Amniocytes Are Receptive to Chemically Induced Reprogramming to Pluripotency.” *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* (2017) 25(2):427-442. doi:10.1016/j.ymthe.2016.11.014
- Holbrook BD “The effects of nicotine on human fetal development”. *Birth Defect Research* (2016) 108:181-192. doi:10.1002/bdrc.21128
- Hukkanen J et al. “Metabolism and disposition kinetics of nicotine”. *Pharmacological Review* (2005) 57(1):79-115. doi: 10.1124/pr.57.1.3
- Izzotti A. et al. “Downregulation of microRNA expression in the lungs of rats exposed to cigarette smoke”. *The FASEB Journal*. 23(3): 806–812 (2009). doi: 10.1096/fj.08-121384
- Jacob N et al. “Fetal exposure to tobacco: nicotine and cotinine concentration in amniotic fluid and maternal saliva”. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* (2017) 30(2):233-239 doi: 10.3109/14767058.2016.1169523
- Jaddoe VW et al. “Maternal smoking and fetal growth characteristics in different periods of pregnancy: the generation R study”. *American Journal of Epidemiology* (2007) 165:1207–1215. doi:10.1093/aje/kwm014
- Janani C et al. “PPARgamma gene – A review”. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews* (2015) 9(1): 46-50. doi: 10.1016/j.dsx.2014.09.015
- Jauniaux E et al. “Fetal amino acid and enzymes levels with maternal smoking”. *Obstet Gynecol* (1999); 93:680
- Jauniaux E and Burton GJ. “Morphological and biological effects of maternal exposure to tobacco smoke on the feto-placental unit”. *Early Human Development* (2007) 83: 699–706. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2007.07.016
- Joubert BR et al. “DNA Methylation in Newborns and Maternal Smoking in Pregnancy: Genome-wide Consortium Meta-analysis.” *American journal of human genetics* (2016) 98(4): 680-96. doi:10.1016/j.ajhg.2016.02.019
- Kim K et al. “Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells.” *Nature* (2010) 467(7313): 285-90. doi:10.1038/nature09342

- Kim VN et al. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Review. Molecular Cell Biology*. (2009) 2:126-39. doi: 10.1038/nrm2632.
- Kim YJ et al. “MicroRNA 21 regulates the proliferation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and high-fat diet-induced obesity alters microRNA 21 expression in white adipose tissues”. *Journal of Cellular Physiology*. (2012)227: 183-193. doi:10.1002/jcp.22716
- Knopik SV et al. “The epigenetics of maternal cigarette smoking during pregnancy and effects on child development.” *Development and psychopathology* (2012) 24(4): 1377-90. doi:10.1017/S0954579412000776
- Liu J et al. “A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation.” *Nature chemical biology* (2014) 10(2): 93-5. doi:10.1038/nchembio.1432
- Liu Y et al. “On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance”. *Cell*. (2016) 165(3):535-50. doi: 10.1016/j.cell.2016.03.014.
- Lock MC et al. “Adverse Intrauterine Environment and Cardiac miRNA Expression.” *International journal of molecular sciences* (2017) 18(12) doi:10.3390/ijms18122628
- Luck W et al. “Extent of nicotine and cotinine transfer to the human fetus, placenta and amniotic fluid of smoking mothers”. *Developmental Pharmacology and Therapeutics*. (1985) 8(6):384-95.
- Maccani MA et al. “Maternal cigarette smoking during pregnancy is associated with down-regulation of miR-16, miR-21, and miR-146a in the placenta. *Epigenetics*. (2010) 5:583–589 doi:10.4161/epi.5.7.12762
- Maccani MA and Knopik SV. “Cigarette smoke exposure-associated alterations to non-coding RNA.” *Frontiers in genetics* (2012) 3(53). doi:10.3389/fgene.2012.00053
- Machaalani R et al. “Cigarette smoking during pregnancy regulates the expression of specific nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunits in the human placenta”. *Toxicology and Applied Pharmacology* (2014) 276(3):204-212. doi:10.1016/j.taap.2014.02.015

- Markunas CA et al. "Identification of DNA methylation changes in newborns related to maternal smoking during pregnancy." *Environmental health perspectives* (2014) 122(10): 1147-53. doi:10.1289/ehp.1307892
- Niu Y et al. "N6-methyl-adenosine (m6A) in RNA: an old modification with a novel epigenetic function." *Genomics, proteomics & bioinformatics* (2013) 11(1): 8-17. doi:10.1016/j.gpb.2012.12.002
- Nogueira J and Andressa N et al. "snoRNA and piRNA expression levels modified by tobacco use in women with lung adenocarcinoma." *PloS one* (2017) 12(8) doi:10.1371/journal.pone.0183410
- Perera F et al. "Prenatal environmental exposures, epigenetics, and disease." *Reproductive toxicology* (2011) 31(3):363-73. doi:10.1016/j.reprotox.2010.12.055
- Pipino C et al. "Molecular and Phenotypic Characterization of Human Amniotic Fluid-Derived Cells: A Morphological and Proteomic Approach". *Stem Cells and Development* (2015) 24(12): 1415-1428. doi: 10.1089/scd.2014.0453
- Pritchard CC et al. "MicroRNA profiling: approaches and considerations". *Nature Reviews Genetics* (2012) 13:358–369. doi: 10.1038/nrg3198
- Rapporto 2018 sulla prevenzione e controllo del tabagismo, D.G. Prevenzione, Ministero della Salute.
- Rogers JM. "Smoking and pregnancy: Epigenetics and developmental origins of the metabolic syndrome". *Birth Defects Research* (2019) 1– 11. doi: 10.1002/bdr2.1550
- Rogers JM. "Tobacco and pregnancy". *Reproductive Toxicology* (2009) 28(2):152-60 doi: 10.1016/j.reprotox.2009.03.012
- Rose JE et al. "Arterial nicotine kinetics during cigarette smoking and intravenous nicotine administration: implications for addiction"- *Drug Alcohol Dependence* (1999) 56:99–107.
- Salihu MH et al, "Impact of intrauterine tobacco exposure on fetal telomere length". *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. (2015).

- Schaal CM et al. "Regulation of Sox2 and stemness by nicotine and electronic-cigarettes in non-small cell lung cancer." *Molecular cancer* (2018) 17(1):149 doi:10.1186/s12943-018-0901-2
- Sidney LE et al. "Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors." *Stem cells* (2014) 32(6): 1380-9. doi:10.1002/stem.1661
- Storr, CL et al. "Smoking estimates from around the world: data from the first 17 participating countries in the World Mental Health Survey Consortium." *Tobacco control* (2010) 19(1): 65-74. doi:10.1136/tc.2009.032474.
- Strachan T and Read A. "Genetica Molecolare Umana". Bologna. Zanichelli. 2016
- Sundar IK and Rahman I. "Gene expression profiling of epigenetic chromatin modification enzymes and histone marks by cigarette smoke: implications for COPD and lung cancer." *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* (2016) 311(6): L1245-L1258. doi:10.1152/ajplung.00253.2016
- Suter M et al. "Maternal tobacco use modestly alters correlated epigenome-wide placental DNA methylation and gene expression." *Epigenetics* (2011) 6(11): 1284-94. doi:10.4161/epi.6.11.17819
- Trojnar M et al. "Associations between Fatty Acid-Binding Protein 4-A Proinflammatory Adipokine and Insulin Resistance, Gestational and Type 2 Diabetes Mellitus." *Cells* (2019) 8(3) doi:10.3390/cells8030227
- Wagner NJ et al. "Prevalence and Perceptions of Electronic Cigarette Use during Pregnancy." *Maternal and child health journal* (2017) 21(8):1655-1661. doi:10.1007/s10995-016-2257-9
- Wang Y et al. "Human bronchial epithelial and endothelial cells express alpha7 nicotinic acetylcholine receptors". *Molecular Pharmacology* (2001) 60(6):1201–1209
- Wu R. et al. "N 6-Methyladenosine (m6A) Methylation in mRNA with A Dynamic and Reversible Epigenetic Modification". *Molecular Biotechnology* (2016) 58: 450. doi:10.1007/s12033-016-9947-9
- Wu Y et al. "Activation of AMPK α 2 in adipocytes is essential for nicotine-induced insulin resistance in vivo." *Nature medicine* (2015) 21:4 373-82. doi:10.1038/nm.3826

Xi S, et al. "Cigarette smoke induces C/EBP-beta-mediated activation of miR-31 in normal human respiratory epithelial and lung cancer cells". *PLoS ONE* (2010). doi: 10.1371/journal.pone.0013764

Zakarya R et al. "Epigenetic impacts of maternal tobacco and e-vapour exposure on the offspring lung." *Clinical epigenetics* (2019) 11(1):32. doi: 10.1186/s13148-019-0631-3

Supplementary table

miRNA Sequenziati

hsa-miR-4640-5p	hsa-miR-15b-5p	hsa-miR-3126-3p	hsa-miR-423-5p	hsa-miR-505-3p	hsa-miR-6772-3p
hsa-let-7a-2-3p	hsa-miR-16-2-3p	hsa-miR-3126-5p	hsa-miR-424-3p	hsa-miR-505-5p	hsa-miR-6775-3p
hsa-let-7a-3p	hsa-miR-16-5p	hsa-miR-3127-3p	hsa-miR-424-5p	hsa-miR-5090	hsa-miR-6776-3p
hsa-let-7a-5p	hsa-miR-17-3p	hsa-miR-3127-5p	hsa-miR-425-3p	hsa-miR-5091	hsa-miR-6777-3p
hsa-let-7b-3p	hsa-miR-17-5p	hsa-miR-3129-3p	hsa-miR-4254	hsa-miR-5100	hsa-miR-6777-5p
hsa-let-7b-5p	hsa-miR-181a-2-3p	hsa-miR-3129-5p	hsa-miR-425-5p	hsa-miR-514a-3p	hsa-miR-6779-3p
hsa-let-7c-5p	hsa-miR-181a-3p	hsa-miR-3130-3p	hsa-miR-4284	hsa-miR-515-5p	hsa-miR-6780b-3p
hsa-let-7d-3p	hsa-miR-181a-5p	hsa-miR-3130-5p	hsa-miR-429	hsa-miR-5187-5p	hsa-miR-6781-3p
hsa-let-7d-5p	hsa-miR-181b-2-3p	hsa-miR-3135b	hsa-miR-431-3p	hsa-miR-5189-5p	hsa-miR-6784-3p
hsa-let-7e-3p	hsa-miR-181b-3p	hsa-miR-3139	hsa-miR-431-5p	hsa-miR-518b	hsa-miR-6785-3p
hsa-let-7e-5p	hsa-miR-181b-5p	hsa-miR-31-3p	hsa-miR-432-3p	hsa-miR-5190	hsa-miR-6786-3p
hsa-let-7f-1-3p	hsa-miR-181c-3p	hsa-miR-3141	hsa-miR-4324	hsa-miR-532-3p	hsa-miR-6787-3p
hsa-let-7f-2-3p	hsa-miR-181c-5p	hsa-miR-3142	hsa-miR-432-5p	hsa-miR-532-5p	hsa-miR-6787-5p
hsa-let-7f-5p	hsa-miR-181d-5p	hsa-miR-3145-3p	hsa-miR-433-3p	hsa-miR-539-3p	hsa-miR-6788-3p
hsa-let-7g-3p	hsa-miR-182-5p	hsa-miR-3149	hsa-miR-433-5p	hsa-miR-539-5p	hsa-miR-6788-5p
hsa-let-7g-5p	hsa-miR-1827	hsa-miR-3157-3p	hsa-miR-4429	hsa-miR-541-3p	hsa-miR-6789-5p
hsa-let-7i-3p	hsa-miR-183-5p	hsa-miR-3157-5p	hsa-miR-4433b-5p	hsa-miR-541-5p	hsa-miR-6791-3p
hsa-let-7i-5p	hsa-miR-184	hsa-miR-3158-3p	hsa-miR-4435	hsa-miR-542-3p	hsa-miR-6791-5p
hsa-miR-100-3p	hsa-miR-185-3p	hsa-miR-31-5p	hsa-miR-4436a	hsa-miR-542-5p	hsa-miR-6793-3p
hsa-miR-100-5p	hsa-miR-185-5p	hsa-miR-3161	hsa-miR-4436b-3p	hsa-miR-543	hsa-miR-6793-5p
hsa-miR-101-3p	hsa-miR-186-3p	hsa-miR-3168	hsa-miR-4436b-5p	hsa-miR-545-5p	hsa-miR-6796-5p
hsa-miR-101-5p	hsa-miR-186-5p	hsa-miR-3170	hsa-miR-4443	hsa-miR-548a-3p	hsa-miR-6797-3p
hsa-miR-103a-2-5p	hsa-miR-187-3p	hsa-miR-3173-3p	hsa-miR-4448	hsa-miR-548ab	hsa-miR-6798-3p
hsa-miR-103a-3p	hsa-miR-188-3p	hsa-miR-3175	hsa-miR-4449	hsa-miR-548al	hsa-miR-6799-3p
hsa-miR-106a-5p	hsa-miR-188-5p	hsa-miR-3176	hsa-miR-4451	hsa-miR-548av-5p	hsa-miR-6802-3p
hsa-miR-106b-3p	hsa-miR-18a-3p	hsa-miR-3177-3p	hsa-miR-4454	hsa-miR-548ay-3p	hsa-miR-6803-3p
hsa-miR-106b-5p	hsa-miR-18a-5p	hsa-miR-3177-5p	hsa-miR-4458	hsa-miR-548az-5p	hsa-miR-6805-3p
hsa-miR-107	hsa-miR-18b-5p	hsa-miR-3180	hsa-miR-4459	hsa-miR-548ba	hsa-miR-6805-5p
hsa-miR-10a-3p	hsa-miR-1908-3p	hsa-miR-3180-3p	hsa-miR-4461	hsa-miR-548e-3p	hsa-miR-6807-3p
hsa-miR-10a-5p	hsa-miR-1908-5p	hsa-miR-3180-5p	hsa-miR-4463	hsa-miR-548e-5p	hsa-miR-6808-3p
hsa-miR-10b-3p	hsa-miR-1909-3p	hsa-miR-3181	hsa-miR-4466	hsa-miR-548k	hsa-miR-6809-3p
hsa-miR-10b-5p	hsa-miR-1909-5p	hsa-miR-3182	hsa-miR-4473	hsa-miR-548l	hsa-miR-6810-3p
hsa-miR-1179	hsa-miR-190a-3p	hsa-miR-3183	hsa-miR-4474-3p	hsa-miR-548n	hsa-miR-6810-5p
hsa-miR-1180-3p	hsa-miR-190a-5p	hsa-miR-3184-3p	hsa-miR-4478	hsa-miR-548o-3p	hsa-miR-6811-5p
hsa-miR-1180-5p	hsa-miR-190b	hsa-miR-3187-3p	hsa-miR-4479	hsa-miR-548q	hsa-miR-6812-3p
hsa-miR-1185-1-3p	hsa-miR-1910-5p	hsa-miR-3187-5p	hsa-miR-4484	hsa-miR-548s	hsa-miR-6814-5p
hsa-miR-1185-2-3p	hsa-miR-1913	hsa-miR-3188	hsa-miR-4485-3p	hsa-miR-548u	hsa-miR-6815-5p
hsa-miR-1185-5p	hsa-miR-191-3p	hsa-miR-3192-5p	hsa-miR-4485-5p	hsa-miR-549a	hsa-miR-6816-3p
hsa-miR-1193	hsa-miR-1914-5p	hsa-miR-3193	hsa-miR-4489	hsa-miR-550a-3-5p	hsa-miR-6817-3p

hsa-miR-1197	hsa-miR-1915-3p	hsa-miR-3195	hsa-miR-4498	hsa-miR-550a-3p	hsa-miR-6818-3p
hsa-miR-1224-3p	hsa-miR-1915-5p	hsa-miR-3200-3p	hsa-miR-449a	hsa-miR-550a-5p	hsa-miR-6818-5p
hsa-miR-1224-5p	hsa-miR-191-5p	hsa-miR-320a	hsa-miR-449c-5p	hsa-miR-551b-3p	hsa-miR-6819-3p
hsa-miR-1225-3p	hsa-miR-192-3p	hsa-miR-320b	hsa-miR-4500	hsa-miR-551b-5p	hsa-miR-6819-5p
hsa-miR-122-5p	hsa-miR-192-5p	hsa-miR-320c	hsa-miR-450a-2-3p	hsa-miR-5579-3p	hsa-miR-6820-3p
hsa-miR-1226-3p	hsa-miR-193a-3p	hsa-miR-320d	hsa-miR-450a-5p	hsa-miR-5581-3p	hsa-miR-6820-5p
hsa-miR-1226-5p	hsa-miR-193a-5p	hsa-miR-320e	hsa-miR-450b-5p	hsa-miR-5585-5p	hsa-miR-6824-3p
hsa-miR-1227-3p	hsa-miR-193b-3p	hsa-miR-323a-3p	hsa-miR-4510	hsa-miR-5587-3p	hsa-miR-6825-5p
hsa-miR-1228-3p	hsa-miR-193b-5p	hsa-miR-323a-5p	hsa-miR-4511	hsa-miR-561-5p	hsa-miR-6827-3p
hsa-miR-1228-5p	hsa-miR-194-3p	hsa-miR-323b-3p	hsa-miR-4512	hsa-miR-5683	hsa-miR-6829-5p
hsa-miR-1229-3p	hsa-miR-194-5p	hsa-miR-32-3p	hsa-miR-451a	hsa-miR-5690	hsa-miR-6830-3p
hsa-miR-1233-3p	hsa-miR-195-5p	hsa-miR-324-3p	hsa-miR-4521	hsa-miR-5695	hsa-miR-6831-3p
hsa-miR-1233-5p	hsa-miR-196a-3p	hsa-miR-324-5p	hsa-miR-452-5p	hsa-miR-5697	hsa-miR-6836-3p
hsa-miR-1234-3p	hsa-miR-196a-5p	hsa-miR-32-5p	hsa-miR-4526	hsa-miR-5699-5p	hsa-miR-6836-5p
hsa-miR-1236-5p	hsa-miR-196b-3p	hsa-miR-326	hsa-miR-454-3p	hsa-miR-5701	hsa-miR-6837-3p
hsa-miR-1237-3p	hsa-miR-196b-5p	hsa-miR-328-3p	hsa-miR-454-5p	hsa-miR-570-3p	hsa-miR-6838-5p
hsa-miR-1237-5p	hsa-miR-1973	hsa-miR-329-3p	hsa-miR-455-3p	hsa-miR-573	hsa-miR-6840-5p
hsa-miR-1243	hsa-miR-197-3p	hsa-miR-329-5p	hsa-miR-455-5p	hsa-miR-574-3p	hsa-miR-6842-3p
hsa-miR-1244	hsa-miR-197-5p	hsa-miR-330-3p	hsa-miR-4636	hsa-miR-576-3p	hsa-miR-6844
hsa-miR-1245a	hsa-miR-1976	hsa-miR-330-5p	hsa-miR-4638-3p	hsa-miR-576-5p	hsa-miR-6845-3p
hsa-miR-1246	hsa-miR-199a-3p	hsa-miR-331-3p	hsa-miR-4638-5p	hsa-miR-577	hsa-miR-6845-5p
hsa-miR-1247-5p	hsa-miR-199a-5p	hsa-miR-331-5p	hsa-miR-4640-3p	hsa-miR-579-5p	hsa-miR-6847-5p
hsa-miR-1248	hsa-miR-199b-5p	hsa-miR-335-3p	hsa-miR-4645-3p	hsa-miR-580-3p	hsa-miR-6848-5p
hsa-miR-1249-3p	hsa-miR-19a-3p	hsa-miR-335-5p	hsa-miR-4646-3p	hsa-miR-582-3p	hsa-miR-6849-3p
hsa-miR-1249-5p	hsa-miR-19a-5p	hsa-miR-337-3p	hsa-miR-4647	hsa-miR-582-5p	hsa-miR-6851-3p
hsa-miR-1252-5p	hsa-miR-19b-3p	hsa-miR-337-5p	hsa-miR-4649-3p	hsa-miR-584-5p	hsa-miR-6851-5p
hsa-miR-1255a	hsa-miR-200a-3p	hsa-miR-338-3p	hsa-miR-4649-5p	hsa-miR-585-3p	hsa-miR-6852-5p
hsa-miR-125a-3p	hsa-miR-200a-5p	hsa-miR-339-3p	hsa-miR-4651	hsa-miR-585-5p	hsa-miR-6854-5p
hsa-miR-125a-5p	hsa-miR-200b-3p	hsa-miR-339-5p	hsa-miR-4655-5p	hsa-miR-588	hsa-miR-6855-5p
hsa-miR-125b-1-3p	hsa-miR-200b-5p	hsa-miR-33a-3p	hsa-miR-466	hsa-miR-589-3p	hsa-miR-6857-3p
hsa-miR-125b-2-3p	hsa-miR-200c-3p	hsa-miR-33a-5p	hsa-miR-4660	hsa-miR-589-5p	hsa-miR-6857-5p
hsa-miR-125b-5p	hsa-miR-203a-3p	hsa-miR-33b-3p	hsa-miR-4661-5p	hsa-miR-590-3p	hsa-miR-6858-3p
hsa-miR-1260a	hsa-miR-204-3p	hsa-miR-33b-5p	hsa-miR-4665-5p	hsa-miR-590-5p	hsa-miR-6858-5p
hsa-miR-1260b	hsa-miR-204-5p	hsa-miR-340-3p	hsa-miR-4666a-5p	hsa-miR-597-3p	hsa-miR-6859-3p
hsa-miR-1262	hsa-miR-205-5p	hsa-miR-340-5p	hsa-miR-4667-3p	hsa-miR-598-3p	hsa-miR-6859-5p
hsa-miR-126-3p	hsa-miR-20a-3p	hsa-miR-342-3p	hsa-miR-4667-5p	hsa-miR-598-5p	hsa-miR-6860
hsa-miR-126-5p	hsa-miR-20a-5p	hsa-miR-342-5p	hsa-miR-4668-5p	hsa-miR-605-5p	hsa-miR-6865-3p
hsa-miR-1270	hsa-miR-20b-5p	hsa-miR-345-5p	hsa-miR-4671-5p	hsa-miR-612	hsa-miR-6868-3p
hsa-miR-1271-5p	hsa-miR-210-3p	hsa-miR-34a-3p	hsa-miR-4677-3p	hsa-miR-6129	hsa-miR-6871-5p
hsa-miR-1273d	hsa-miR-210-5p	hsa-miR-34a-5p	hsa-miR-4677-5p	hsa-miR-6131	hsa-miR-6873-5p
hsa-miR-127-3p	hsa-miR-2110	hsa-miR-34b-3p	hsa-miR-4685-3p	hsa-miR-6132	hsa-miR-6875-5p
hsa-miR-1275	hsa-miR-2114-3p	hsa-miR-34b-5p	hsa-miR-4687-3p	hsa-miR-6134	hsa-miR-6876-5p
hsa-miR-127-5p	hsa-miR-2114-5p	hsa-miR-34c-3p	hsa-miR-4687-5p	hsa-miR-615-3p	hsa-miR-6877-5p
hsa-miR-1276	hsa-miR-2116-3p	hsa-miR-34c-5p	hsa-miR-4688	hsa-miR-616-3p	hsa-miR-6879-3p
hsa-miR-1277-3p	hsa-miR-212-3p	hsa-miR-3605-3p	hsa-miR-4700-3p	hsa-miR-616-5p	hsa-miR-6880-3p

hsa-miR-1277-5p	hsa-miR-212-5p	hsa-miR-3605-5p	hsa-miR-4707-3p	hsa-miR-618	hsa-miR-6881-3p
hsa-miR-1278	hsa-miR-21-3p	hsa-miR-3607-3p	hsa-miR-4709-3p	hsa-miR-625-3p	hsa-miR-6882-5p
hsa-miR-128-1-5p	hsa-miR-214-3p	hsa-miR-3607-5p	hsa-miR-4709-5p	hsa-miR-625-5p	hsa-miR-6885-5p
hsa-miR-128-2-5p	hsa-miR-215-5p	hsa-miR-3609	hsa-miR-4712-3p	hsa-miR-627-3p	hsa-miR-6886-3p
hsa-miR-1283	hsa-miR-21-5p	hsa-miR-3611	hsa-miR-4714-3p	hsa-miR-627-5p	hsa-miR-6886-5p
hsa-miR-128-3p	hsa-miR-216a-3p	hsa-miR-3613-5p	hsa-miR-4716-3p	hsa-miR-628-3p	hsa-miR-6888-3p
hsa-miR-1284	hsa-miR-216a-5p	hsa-miR-361-3p	hsa-miR-4717-3p	hsa-miR-628-5p	hsa-miR-6889-3p
hsa-miR-1286	hsa-miR-217	hsa-miR-3615	hsa-miR-4723-3p	hsa-miR-629-5p	hsa-miR-6891-5p
hsa-miR-1287-5p	hsa-miR-218-2-3p	hsa-miR-361-5p	hsa-miR-4725-3p	hsa-miR-636	hsa-miR-6892-5p
hsa-miR-1291	hsa-miR-218-5p	hsa-miR-3620-3p	hsa-miR-4725-5p	hsa-miR-641	hsa-miR-6894-3p
hsa-miR-1292-3p	hsa-miR-219a-1-3p	hsa-miR-3620-5p	hsa-miR-4728-3p	hsa-miR-6500-3p	hsa-miR-6894-5p
hsa-miR-129-2-3p	hsa-miR-219a-5p	hsa-miR-3622a-3p	hsa-miR-4728-5p	hsa-miR-6505-3p	hsa-miR-6895-3p
hsa-miR-1292-5p	hsa-miR-219b-3p	hsa-miR-3622a-5p	hsa-miR-4737	hsa-miR-6508-5p	hsa-miR-708-3p
hsa-miR-1293	hsa-miR-219b-5p	hsa-miR-362-3p	hsa-miR-4741	hsa-miR-6509-5p	hsa-miR-708-5p
hsa-miR-1294	hsa-miR-221-3p	hsa-miR-362-5p	hsa-miR-4742-3p	hsa-miR-6511a-3p	hsa-miR-7106-3p
hsa-miR-129-5p	hsa-miR-221-5p	hsa-miR-3651	hsa-miR-4742-5p	hsa-miR-6511a-5p	hsa-miR-7106-5p
hsa-miR-1296-5p	hsa-miR-222-3p	hsa-miR-3653-3p	hsa-miR-4743-3p	hsa-miR-6511b-3p	hsa-miR-7108-3p
hsa-miR-1299	hsa-miR-222-5p	hsa-miR-3653-5p	hsa-miR-4743-5p	hsa-miR-6511b-5p	hsa-miR-7108-5p
hsa-miR-1301-3p	hsa-miR-223-3p	hsa-miR-365a-3p	hsa-miR-4745-3p	hsa-miR-6512-5p	hsa-miR-7109-3p
hsa-miR-1302	hsa-miR-22-3p	hsa-miR-365a-5p	hsa-miR-4745-5p	hsa-miR-6513-5p	hsa-miR-7110-3p
hsa-miR-1304-3p	hsa-miR-224-3p	hsa-miR-365b-5p	hsa-miR-4746-5p	hsa-miR-6514-5p	hsa-miR-7110-5p
hsa-miR-1304-5p	hsa-miR-224-5p	hsa-miR-3661	hsa-miR-4749-3p	hsa-miR-6515-3p	hsa-miR-7111-3p
hsa-miR-1305	hsa-miR-22-5p	hsa-miR-3677-3p	hsa-miR-4750-5p	hsa-miR-6515-5p	hsa-miR-7111-5p
hsa-miR-1306-3p	hsa-miR-2277-3p	hsa-miR-3679-5p	hsa-miR-4757-3p	hsa-miR-651-5p	hsa-miR-7113-5p
hsa-miR-1306-5p	hsa-miR-2277-5p	hsa-miR-3685	hsa-miR-4758-3p	hsa-miR-6516-3p	hsa-miR-7114-3p
hsa-miR-1307-3p	hsa-miR-2355-3p	hsa-miR-3687	hsa-miR-4761-3p	hsa-miR-6516-5p	hsa-miR-7-1-3p
hsa-miR-1307-5p	hsa-miR-2355-5p	hsa-miR-3691-5p	hsa-miR-4762-5p	hsa-miR-652-3p	hsa-miR-718
hsa-miR-130a-3p	hsa-miR-2392	hsa-miR-369-3p	hsa-miR-4766-5p	hsa-miR-652-5p	hsa-miR-744-3p
hsa-miR-130b-3p	hsa-miR-23a-3p	hsa-miR-369-5p	hsa-miR-4767	hsa-miR-653-3p	hsa-miR-744-5p
hsa-miR-130b-5p	hsa-miR-23a-5p	hsa-miR-370-3p	hsa-miR-4775	hsa-miR-653-5p	hsa-miR-758-3p
hsa-miR-1322	hsa-miR-23b-3p	hsa-miR-370-5p	hsa-miR-4783-3p	hsa-miR-654-3p	hsa-miR-758-5p
hsa-miR-1323	hsa-miR-23b-5p	hsa-miR-374a-3p	hsa-miR-4787-3p	hsa-miR-654-5p	hsa-miR-7-5p
hsa-miR-132-3p	hsa-miR-23c	hsa-miR-374a-5p	hsa-miR-4787-5p	hsa-miR-655-3p	hsa-miR-760
hsa-miR-132-5p	hsa-miR-24-1-5p	hsa-miR-374b-3p	hsa-miR-4788	hsa-miR-656-3p	hsa-miR-7641
hsa-miR-133a-3p	hsa-miR-24-2-5p	hsa-miR-374b-5p	hsa-miR-4791	hsa-miR-659-5p	hsa-miR-765
hsa-miR-1343-3p	hsa-miR-24-3p	hsa-miR-374c-5p	hsa-miR-4792	hsa-miR-660-3p	hsa-miR-766-3p
hsa-miR-134-3p	hsa-miR-2467-5p	hsa-miR-375	hsa-miR-4797-3p	hsa-miR-660-5p	hsa-miR-769-3p
hsa-miR-134-5p	hsa-miR-25-3p	hsa-miR-376a-2-5p	hsa-miR-4802-3p	hsa-miR-664a-3p	hsa-miR-769-5p
hsa-miR-135a-5p	hsa-miR-25-5p	hsa-miR-376a-3p	hsa-miR-4804-5p	hsa-miR-664a-5p	hsa-miR-7703
hsa-miR-135b-5p	hsa-miR-2682-3p	hsa-miR-376a-5p	hsa-miR-483-3p	hsa-miR-664b-3p	hsa-miR-7704
hsa-miR-136-3p	hsa-miR-2682-5p	hsa-miR-376b-3p	hsa-miR-483-5p	hsa-miR-664b-5p	hsa-miR-7705
hsa-miR-136-5p	hsa-miR-26a-1-3p	hsa-miR-376b-5p	hsa-miR-484	hsa-miR-665	hsa-miR-770-5p
hsa-miR-137	hsa-miR-26a-2-3p	hsa-miR-376c-3p	hsa-miR-485-3p	hsa-miR-668-3p	hsa-miR-7706
hsa-miR-138-1-3p	hsa-miR-26a-5p	hsa-miR-376c-5p	hsa-miR-485-5p	hsa-miR-671-3p	hsa-miR-7845-5p
hsa-miR-138-2-3p	hsa-miR-26b-3p	hsa-miR-377-3p	hsa-miR-486-3p	hsa-miR-671-5p	hsa-miR-7854-3p

hsa-miR-138-5p	hsa-miR-26b-5p	hsa-miR-377-5p	hsa-miR-486-5p	hsa-miR-6716-3p	hsa-miR-7974
hsa-miR-139-3p	hsa-miR-27a-3p	hsa-miR-378a-3p	hsa-miR-487a-3p	hsa-miR-6721-5p	hsa-miR-7975
hsa-miR-139-5p	hsa-miR-27a-5p	hsa-miR-378a-5p	hsa-miR-487a-5p	hsa-miR-6723-5p	hsa-miR-7977
hsa-miR-1-3p	hsa-miR-27b-3p	hsa-miR-378c	hsa-miR-487b-3p	hsa-miR-6726-3p	hsa-miR-8072
hsa-miR-140-3p	hsa-miR-27b-5p	hsa-miR-378d	hsa-miR-487b-5p	hsa-miR-6727-3p	hsa-miR-873-3p
hsa-miR-140-5p	hsa-miR-28-3p	hsa-miR-378e	hsa-miR-489-3p	hsa-miR-6727-5p	hsa-miR-873-5p
hsa-miR-141-3p	hsa-miR-28-5p	hsa-miR-378f	hsa-miR-490-3p	hsa-miR-6729-3p	hsa-miR-874-3p
hsa-miR-141-5p	hsa-miR-296-3p	hsa-miR-378g	hsa-miR-490-5p	hsa-miR-6730-5p	hsa-miR-874-5p
hsa-miR-142-3p	hsa-miR-296-5p	hsa-miR-378i	hsa-miR-491-3p	hsa-miR-6732-3p	hsa-miR-876-3p
hsa-miR-142-5p	hsa-miR-299-3p	hsa-miR-379-3p	hsa-miR-491-5p	hsa-miR-6734-5p	hsa-miR-877-3p
hsa-miR-143-3p	hsa-miR-299-5p	hsa-miR-379-5p	hsa-miR-493-3p	hsa-miR-6735-3p	hsa-miR-877-5p
hsa-miR-143-5p	hsa-miR-29a-3p	hsa-miR-380-3p	hsa-miR-493-5p	hsa-miR-6735-5p	hsa-miR-885-5p
hsa-miR-144-3p	hsa-miR-29a-5p	hsa-miR-380-5p	hsa-miR-494-3p	hsa-miR-6736-3p	hsa-miR-887-3p
hsa-miR-144-5p	hsa-miR-29b-1-5p	hsa-miR-381-3p	hsa-miR-494-5p	hsa-miR-6736-5p	hsa-miR-887-5p
hsa-miR-145-3p	hsa-miR-29b-2-5p	hsa-miR-381-5p	hsa-miR-495-3p	hsa-miR-6737-3p	hsa-miR-889-3p
hsa-miR-145-5p	hsa-miR-29b-3p	hsa-miR-382-3p	hsa-miR-496	hsa-miR-6739-3p	hsa-miR-889-5p
hsa-miR-1468-5p	hsa-miR-29c-3p	hsa-miR-382-5p	hsa-miR-497-5p	hsa-miR-6740-5p	hsa-miR-921
hsa-miR-146a-3p	hsa-miR-29c-5p	hsa-miR-383-5p	hsa-miR-4999-3p	hsa-miR-6741-3p	hsa-miR-922
hsa-miR-146a-5p	hsa-miR-301a-3p	hsa-miR-3909	hsa-miR-499a-5p	hsa-miR-6742-3p	hsa-miR-92a-1-5p
hsa-miR-146b-3p	hsa-miR-301b-3p	hsa-miR-3912-3p	hsa-miR-5000-3p	hsa-miR-6743-3p	hsa-miR-92a-3p
hsa-miR-146b-5p	hsa-miR-302a-3p	hsa-miR-3913-3p	hsa-miR-5001-3p	hsa-miR-6746-3p	hsa-miR-92b-3p
hsa-miR-147b	hsa-miR-302a-5p	hsa-miR-3913-5p	hsa-miR-5001-5p	hsa-miR-6747-3p	hsa-miR-92b-5p
hsa-miR-148a-3p	hsa-miR-302c-3p	hsa-miR-3916	hsa-miR-5002-5p	hsa-miR-6749-3p	hsa-miR-93-3p
hsa-miR-148a-5p	hsa-miR-3065-3p	hsa-miR-3917	hsa-miR-5006-3p	hsa-miR-6750-3p	hsa-miR-935
hsa-miR-148b-3p	hsa-miR-3065-5p	hsa-miR-3928-3p	hsa-miR-5008-3p	hsa-miR-6751-5p	hsa-miR-93-5p
hsa-miR-148b-5p	hsa-miR-30a-3p	hsa-miR-3929	hsa-miR-5009-5p	hsa-miR-6752-3p	hsa-miR-937-3p
hsa-miR-149-3p	hsa-miR-30a-5p	hsa-miR-3940-3p	hsa-miR-500a-3p	hsa-miR-6752-5p	hsa-miR-937-5p
hsa-miR-149-5p	hsa-miR-30b-3p	hsa-miR-3940-5p	hsa-miR-500a-5p	hsa-miR-6753-3p	hsa-miR-939-3p
hsa-miR-150-5p	hsa-miR-30b-5p	hsa-miR-3943	hsa-miR-500b-3p	hsa-miR-675-3p	hsa-miR-939-5p
hsa-miR-151a-3p	hsa-miR-30c-1-3p	hsa-miR-3944-3p	hsa-miR-500b-5p	hsa-miR-6754-3p	hsa-miR-940
hsa-miR-151a-5p	hsa-miR-30c-2-3p	hsa-miR-409-3p	hsa-miR-5010-3p	hsa-miR-675-5p	hsa-miR-941
hsa-miR-151b	hsa-miR-30c-5p	hsa-miR-409-5p	hsa-miR-5010-5p	hsa-miR-6756-3p	hsa-miR-942-5p
hsa-miR-152-3p	hsa-miR-30d-3p	hsa-miR-410-3p	hsa-miR-501-3p	hsa-miR-6757-3p	hsa-miR-943
hsa-miR-152-5p	hsa-miR-30d-5p	hsa-miR-410-5p	hsa-miR-501-5p	hsa-miR-6762-3p	hsa-miR-944
hsa-miR-153-3p	hsa-miR-30e-3p	hsa-miR-411-3p	hsa-miR-502-3p	hsa-miR-6763-3p	hsa-miR-95-3p
hsa-miR-1538	hsa-miR-30e-5p	hsa-miR-411-5p	hsa-miR-502-5p	hsa-miR-6763-5p	hsa-miR-95-5p
hsa-miR-154-5p	hsa-miR-3117-3p	hsa-miR-412-3p	hsa-miR-503-3p	hsa-miR-6767-5p	hsa-miR-9-5p
hsa-miR-155-5p	hsa-miR-3120-3p	hsa-miR-412-5p	hsa-miR-503-5p	hsa-miR-6769b-3p	hsa-miR-96-5p
hsa-miR-15a-5p	hsa-miR-3123	hsa-miR-421	hsa-miR-504-3p	hsa-miR-6770-3p	hsa-miR-98-3p
hsa-miR-15b-3p	hsa-miR-3124-5p	hsa-miR-423-3p	hsa-miR-504-5p	hsa-miR-6770-5p	hsa-miR-98-5p
					hsa-miR-99a-3p
					hsa-miR-99a-5p
					hsa-miR-99b-3p
					hsa-miR-99b-5p