Identificazione dell’asse miRNA-3185/CYP4A11 nel tessuto cardiaco come bioindicatore dell’asfissia meccanica

CORSO DI STUDI: scienze biologiche
UNIVERSITA’ POLITECNICA DELLE MARCHE

REFERENTE: Marco Barucca
STUDENTE: Giulia Faccini
MATRICOLA: s1081461

ANNO ACCADEMICO: 2019/2020
SESSIONE DI LAUREA: ottobre 2020

INTRODUZIONE

L'asfissia meccanica è una delle principali cause di morte non naturale.

Difficile da riconoscere per assenza di marcatori specifici sull’organismo.

I micro-RNA e alcune proteine sono fondamentali durante le autopsie per risalire alla causa del decesso.

La durata e l’intensità dell’ipossia causano variazioni nel livello di espressione di alcuni miRNA, ciò è fondamentale per distinguere l’asfissia meccanica da altre cause di decesso.

Fig1: www.thermofisher.com

Micro-RNA

- Piccoli RNA non codificanti implicati nella regolazione genica.
- Riconoscono mRNA target causandone la degradazione.
- Controllati da fattori di trascrizione in risposta a stimoli endogeni ed esogeni.
- Altamente stabili anche molte ore dopo il decesso.
- Facilmente estraibili da campioni di tessuto.

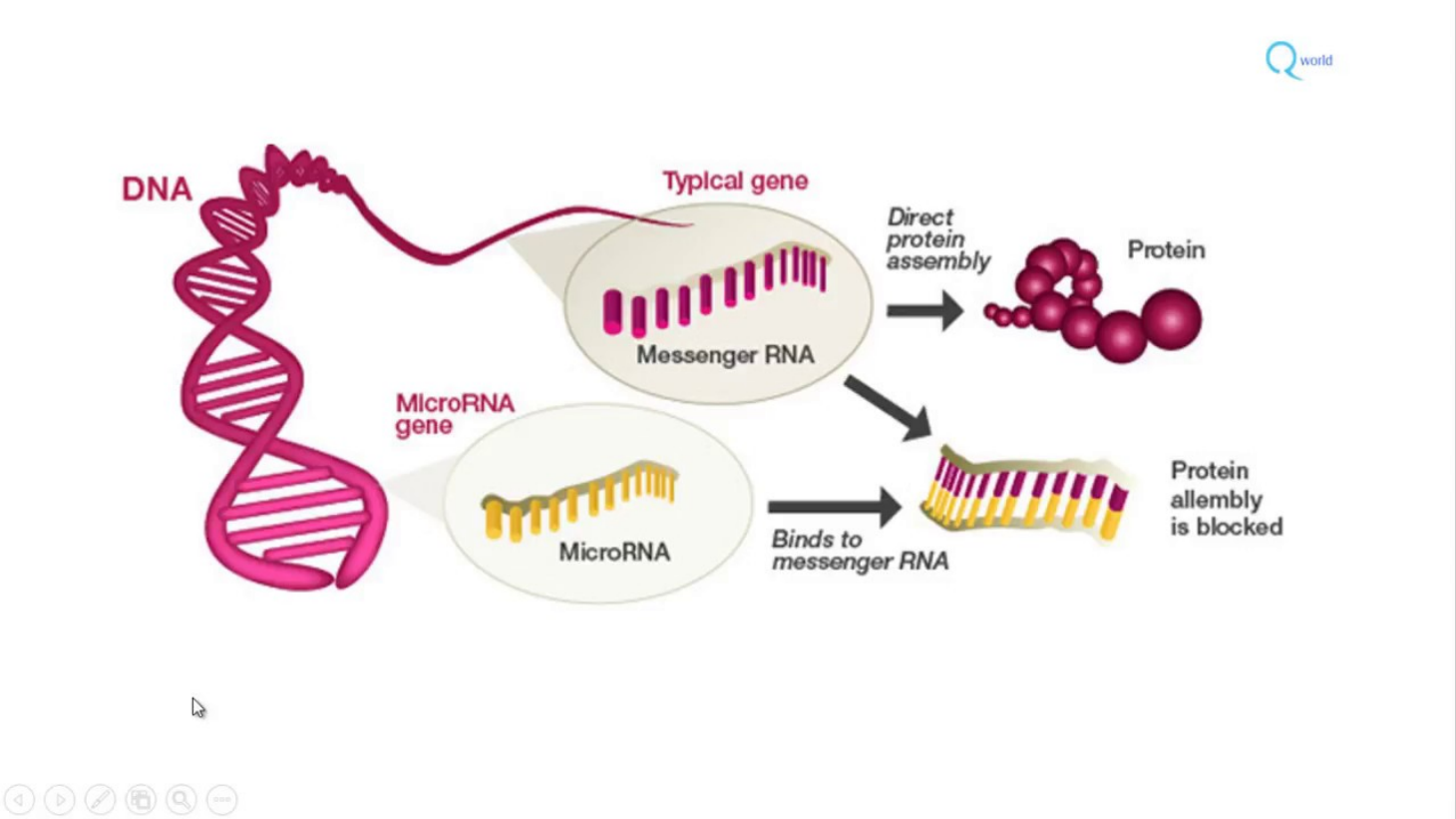

Fig2: www.thermofisher.com

MATERIALI E METODI

- 51 autopsie su soggetti deceduti per cause diverse;
- Diversi intervalli postmortem: 1.5h-30.5h;
- Età diversa: 2-88 anni
- Diversa temperatura: 5°C-40°C;
- Estrazione di tessuto dalla regione apicale del cuore;
- Campioni 1cm x 1 cm x 1 cm conservati a -80°C.

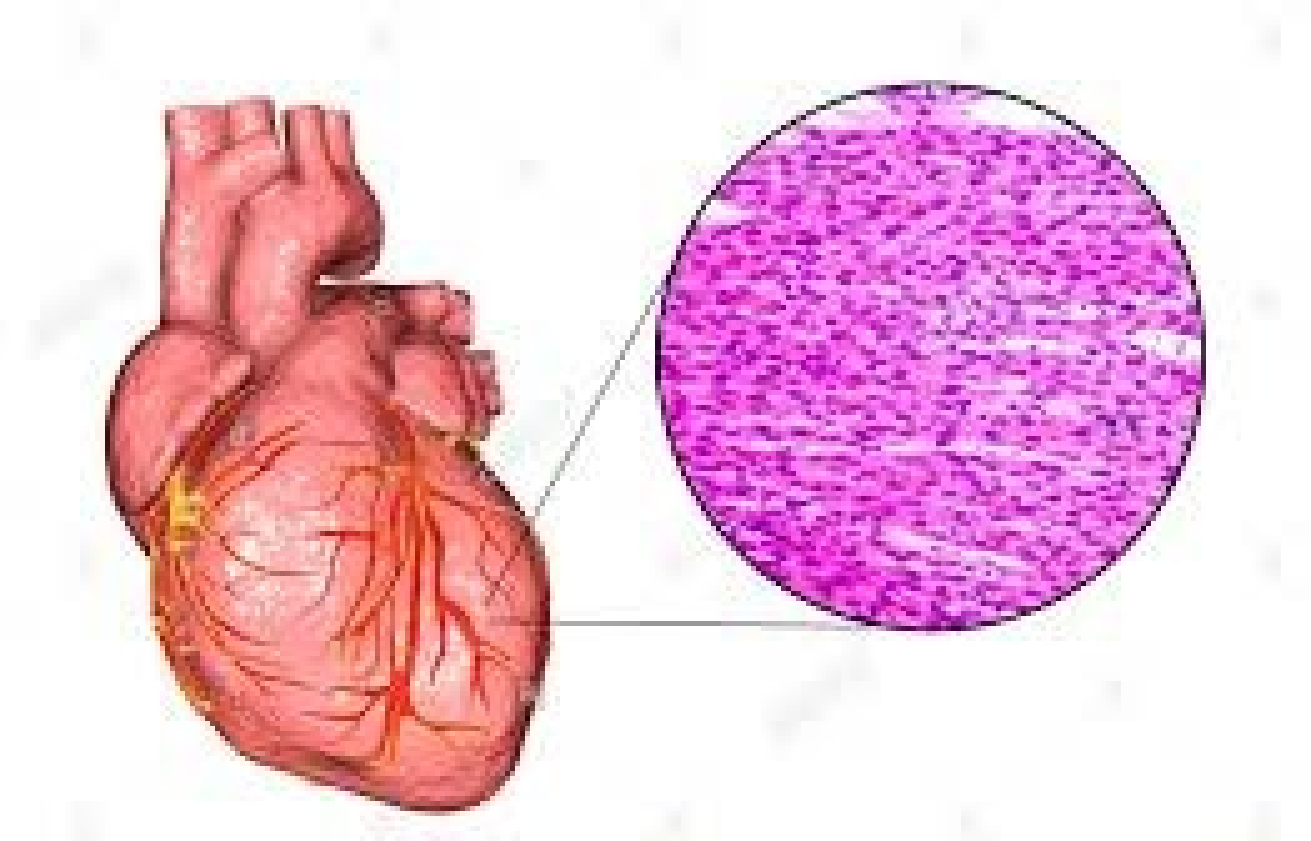

Fig4: Royalty Free Muscular Contraction Clip Art, Vector Images

Estrazione RNA e real-time PCR

- RNA estratto, isolato e trascritto in cDNA.
- cDNA usato per la real-time PCR quantitativa.
- Il mix della reazione è stato fatto correre su ABI Prism 7500.

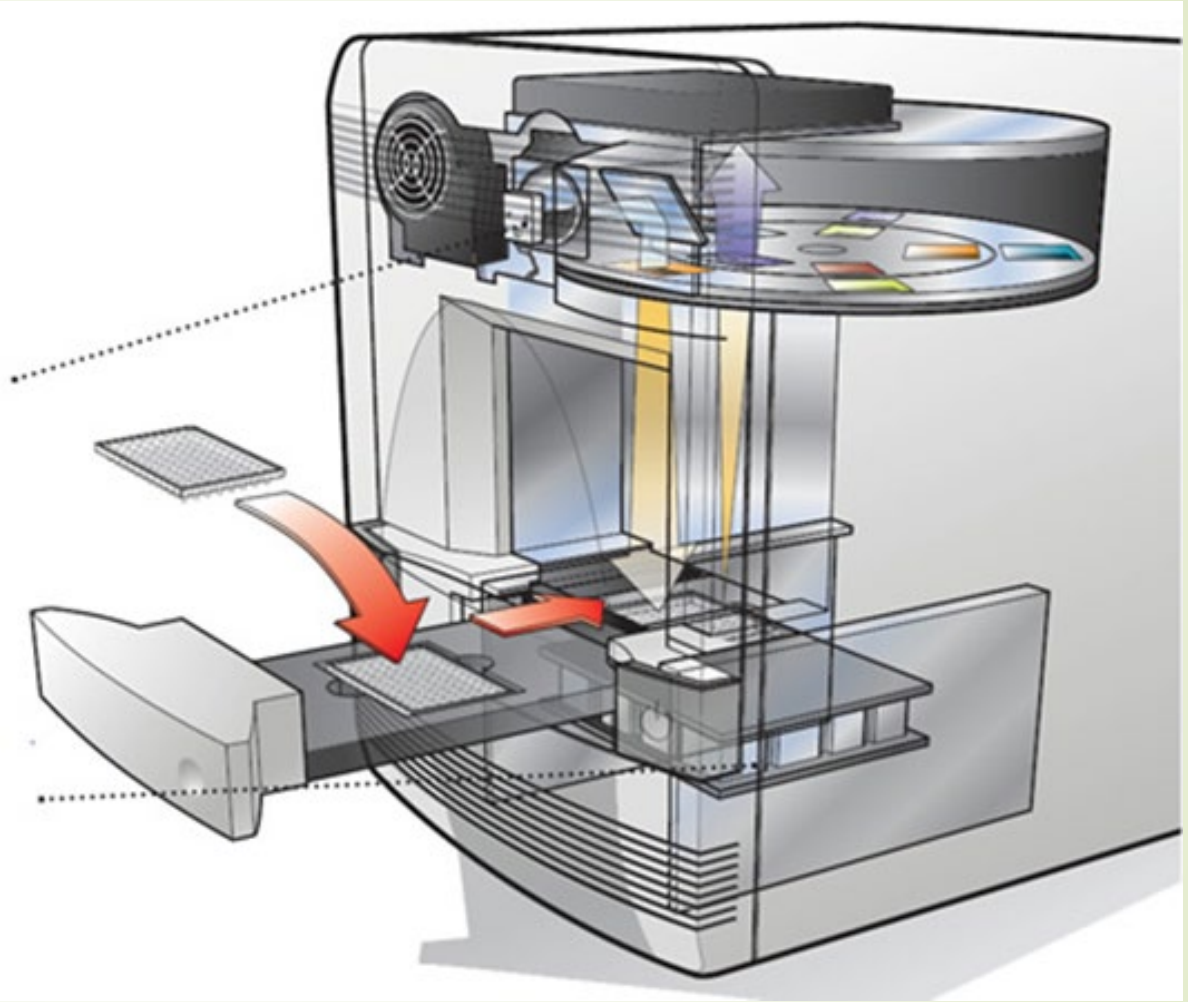

Fig4: How it Works: Real Time PCR | The Scientist Magazine

Western blot

- Proteine estratte dai campioni e sottoposte a SDS-PAGE,
- Trasferimento su membrana,
- Campione incubato con anticorpo primario per CYP4A11 tutta la notte,
- Campione incubato con anticorpo secondario per 1h,
- Bande proteiche visualizzate con ECL e segnale quantificato con ImageJ v.1.28.

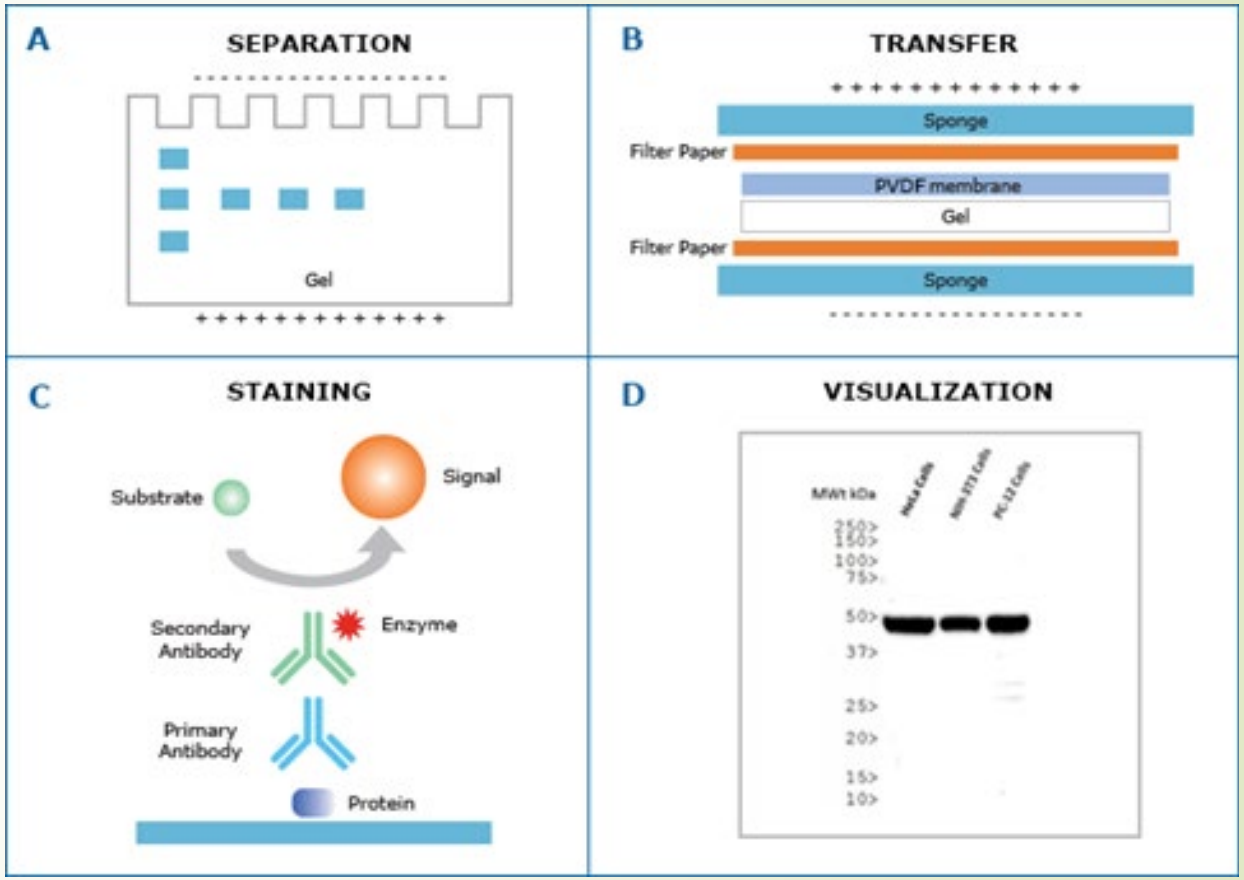

Fig5:Western Blotting Products and Resources: Novus Biologicals

Saggio di attività della luciferasi

Due eventi di clonaggio:

1. Regione 3' UTR del gene CYP4A11 wild type contenente il sito di legame per miRNA-3185,
2. Regione 3'UTR mutata del gene con sito di legame mutato.

Vettori inseriti in cellule HEK-293 T sottoposte a fluorescenza dopo 48h di trasfezione.

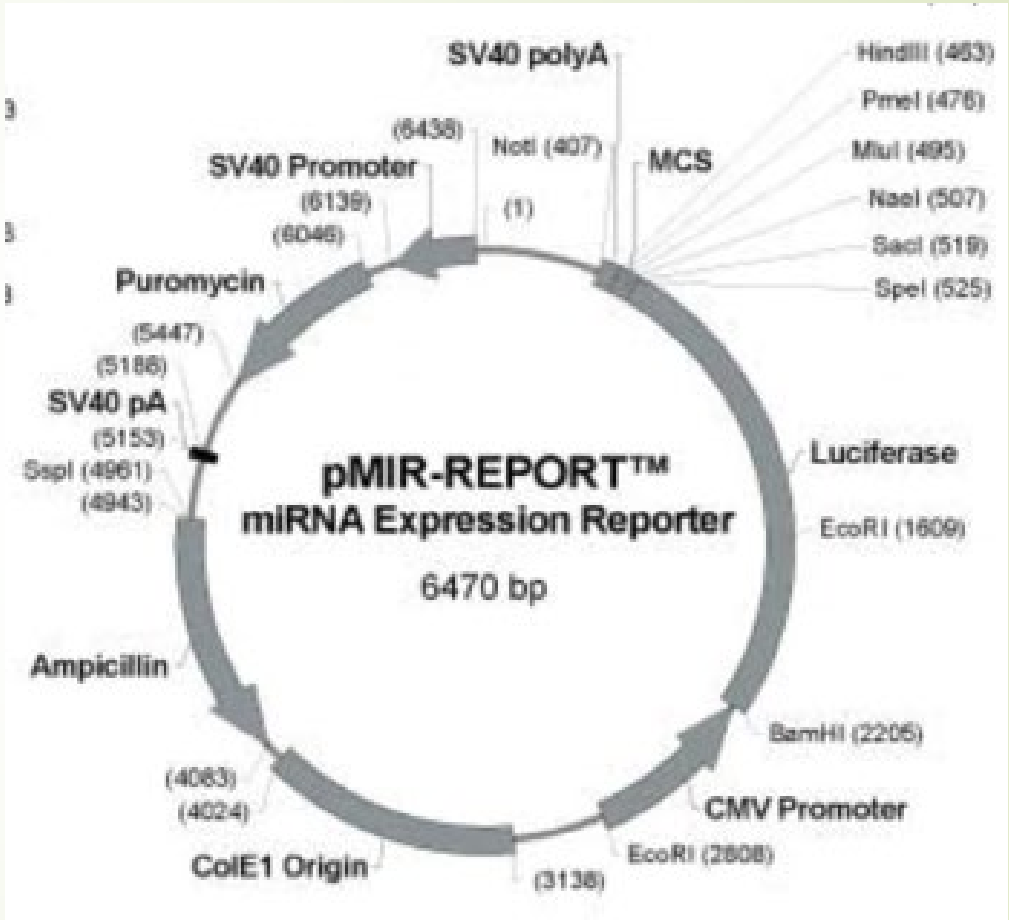

Fig6: pMIR-REPORT™ miRNA Expression Reporter Vector System

Analisi della funzione

- Usando il database UniProt si è risaliti alle funzioni di CYP4A11 alcune delle quali sono regolate dall'ipossia.

Table 2
GO analysis of the target gene *CYP4A11*.

Molecular function	Alkane 1-monooxygenase activity
	Arachidonic acid epoxygenase activity
	Heme binding
	Iron ion binding
	Leukotriene-B4 20-monooxygenase activity
	Monooxygenase activity
	Oxygen binding
Biological process	Arachidonic acid metabolic process
	Epoxygenase P450 pathway
	Fatty acid metabolic process
	Leukotriene metabolic process
	Long-chain fatty acid metabolic process
	Omega-hydroxylase P450 pathway
	Oxidation-reduction process
	Positive regulation of icosanoid secretion
	Pressure natriuresis
	Regulation of lipid metabolic process
	Renal water homeostasis
	Sodium ion homeostasis

Fig7: https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110293

Analisi statistica

- Analisi dell'espressione di RNA messaggeri e miRNA utilizzando la piattaforma GraphPad Prism 6.0.
- t-test e test non parametrici (Mann-Whitney e Spearman).

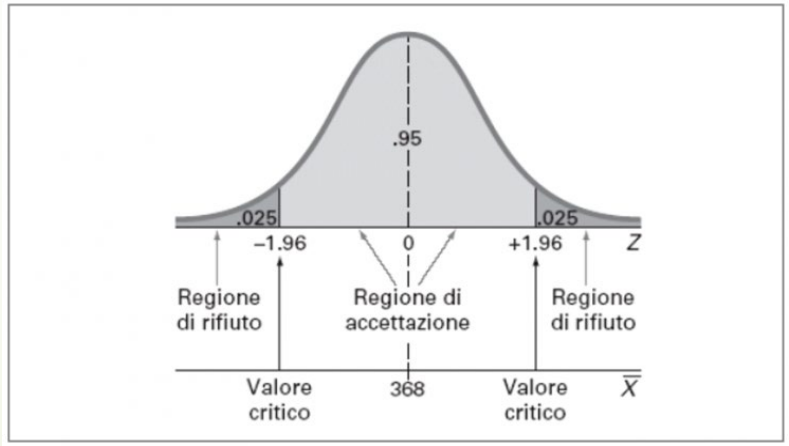

Fig8:Levine, Krehbiel, Berenson Statistica, Casa editrice: Pearson

RISULTATI

- Real-time qPCR per esaminare l'espressione del miRNA-3185.
- miRNA-3185 aumenta notevolmente di concentrazione nei tessuti cardiaci di soggetti deceduti per asfissia meccanica.

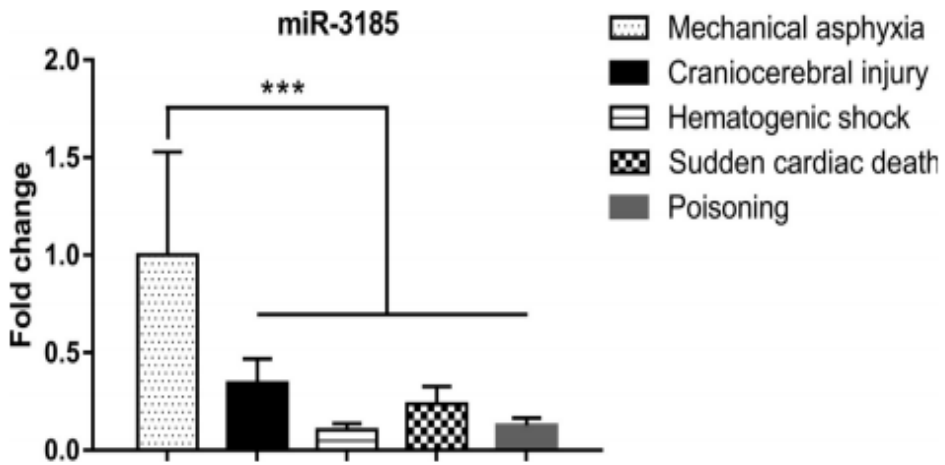

Fig. 1. Real-time qPCR validation of miRNA-3185 expression in human heart specimens. The relative expression of miR-3185 in human cardiac tissues from cases o mechanical asphyxia ($n = 14$), craniocerebral injury ($n = 14$), hemorrhagic shock ($n = 14$), sudden cardiac death ($n = 5$) and poisoning ($n = 4$) were determined by real-time qPCR analysis. ***, $P < 0.001$.

Fig9: https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110293

Analisi di Spearman

- PMI→ influenza la degradazione di miRNA;
- Età→regola l'espressione dei geni;
- Non c'e correlazione tra l'espressione di miRNA-3185 e l'intervallo postmortem, l'età e la temperatura.

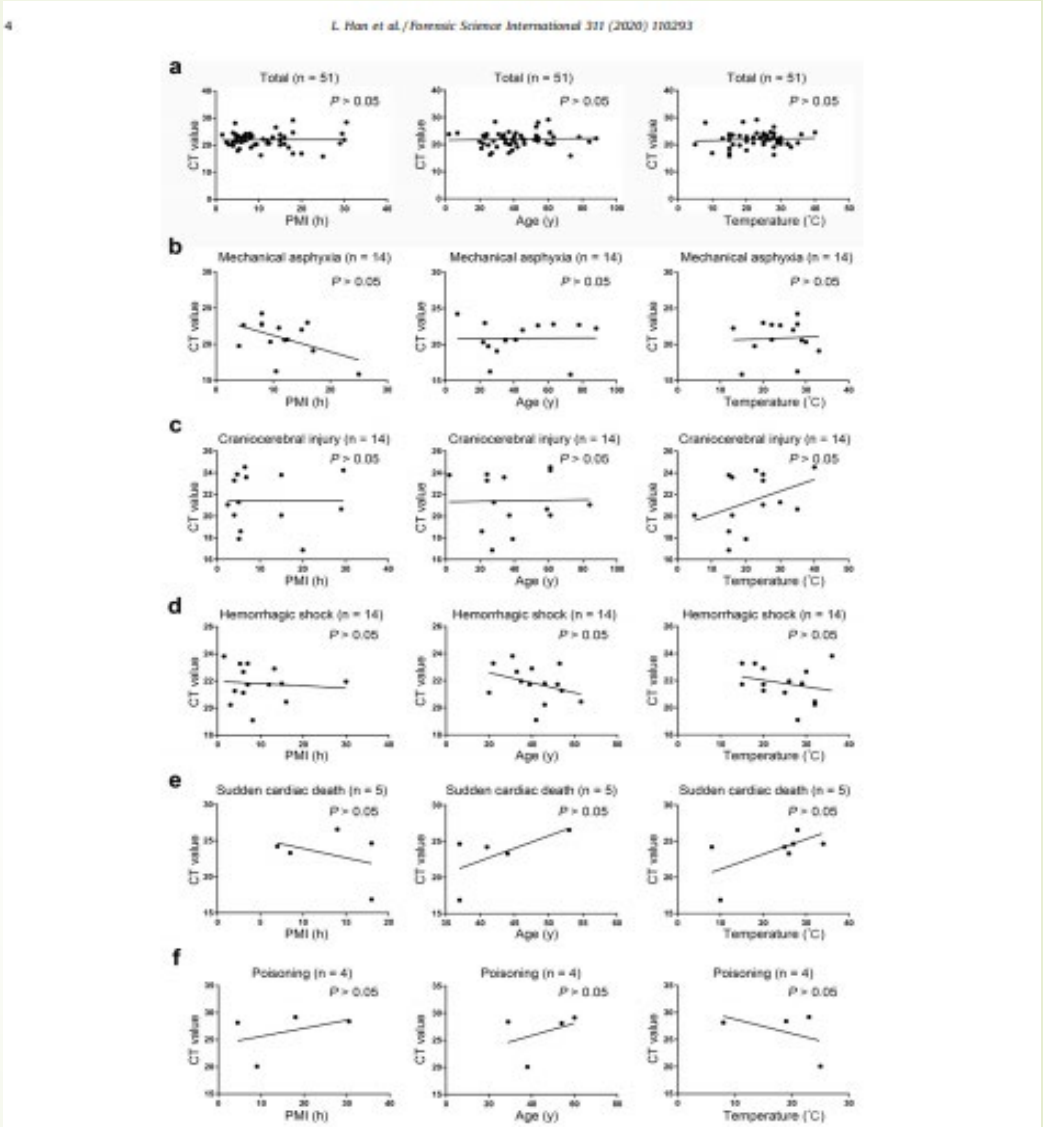

Fig. 2. Correlation of Ct values of miRNA-3185 expression with postmortem of death, environmental temperature and age, respectively. The correlation between Ct values and postmortem interval (PMI), age and temperature were assessed with Spearman analysis in total 51 human heart samples (a), or cardiac tissues from subgroups of mechanical asphyxia (b), craniocerebral injury (c), hemorrhagic shock (d), sudden cardiac death (e), and poisoning (f).

Fig10: https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110293

Effetti dell'aumento di miRNA-3185 sui geni target

- Gli algoritmi predittivi hanno evidenziato 12 possibili geni regolati da miRNA-3185.

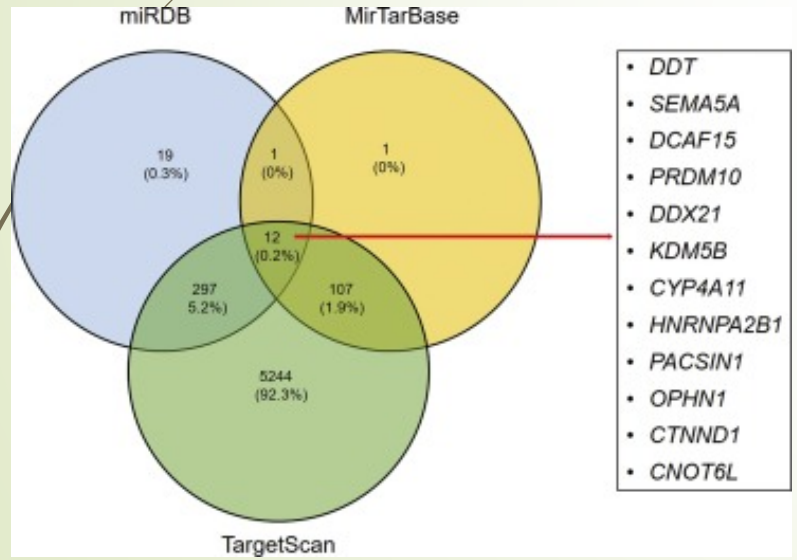

Fig11: https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110293

- Tra i 12 geni solo l'espressione di CYP4A11 (cytochrome P450 4A11) era notevolmente ridotta nei casi di asfissia meccanica.

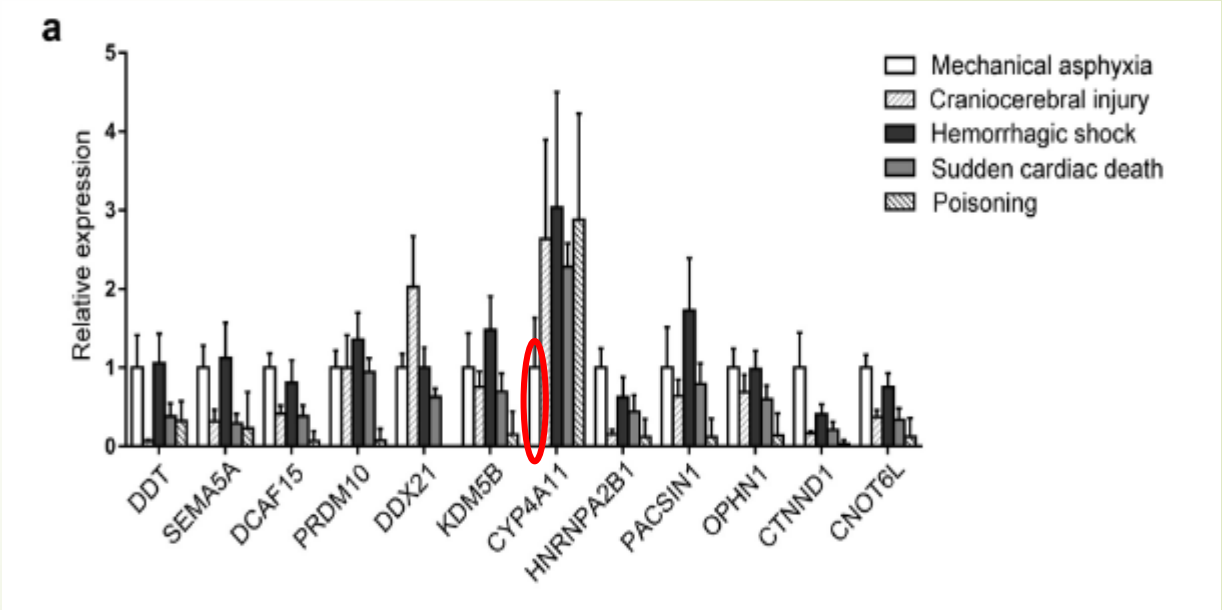

Fig12: https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110293

CYP4A11 gene target di miRNA-3185

- Tramite il western blot si notò che la quantità di proteine codificate da CYP4A11 si riduceva notevolmente in seguito a morte per asfissia meccanica.

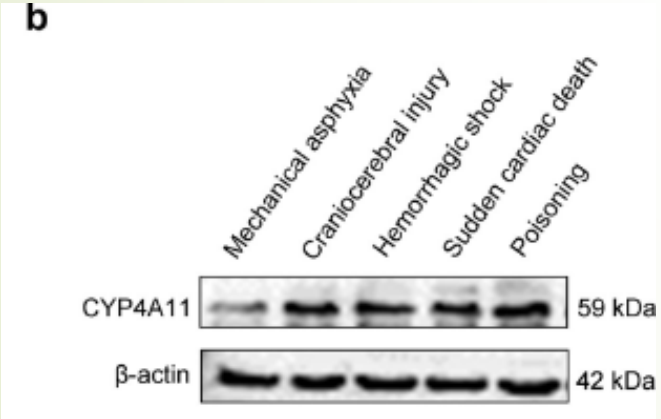

Fig13: https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110293

- La conferma che CYP4A11 fosse il gene target di miRNA-3185 si ebbe usando il saggio dell'attività della luciferasi.

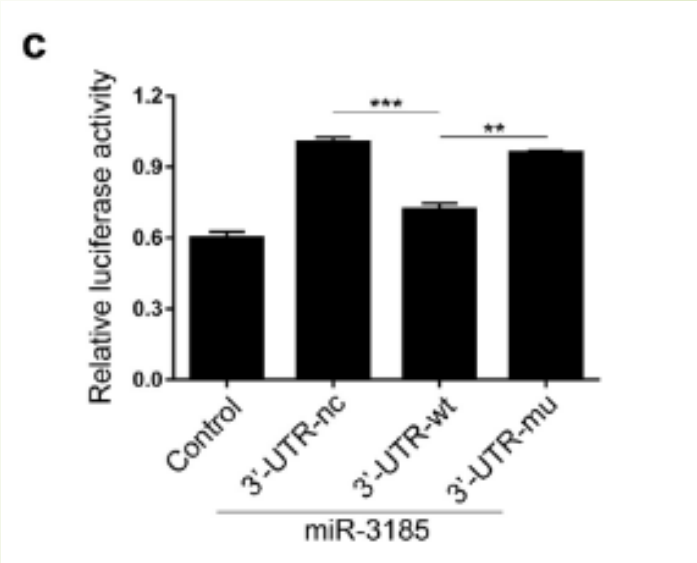

Fig14: https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110293

DISCUSSIONE

Marcatori della morte per asfissia meccanica:

- Aumento di concentrazione di SP-A e HIF1-α;
- Variazioni nell'espressione di alcuni miRNA:

a) riduzione di miRNA-199a→ sovra regolazione di HIF1-α,

b) Riduzione miRNA-122→regola il glucosio e il metabolismo energetico,

c) aumento di miRNA-3185.

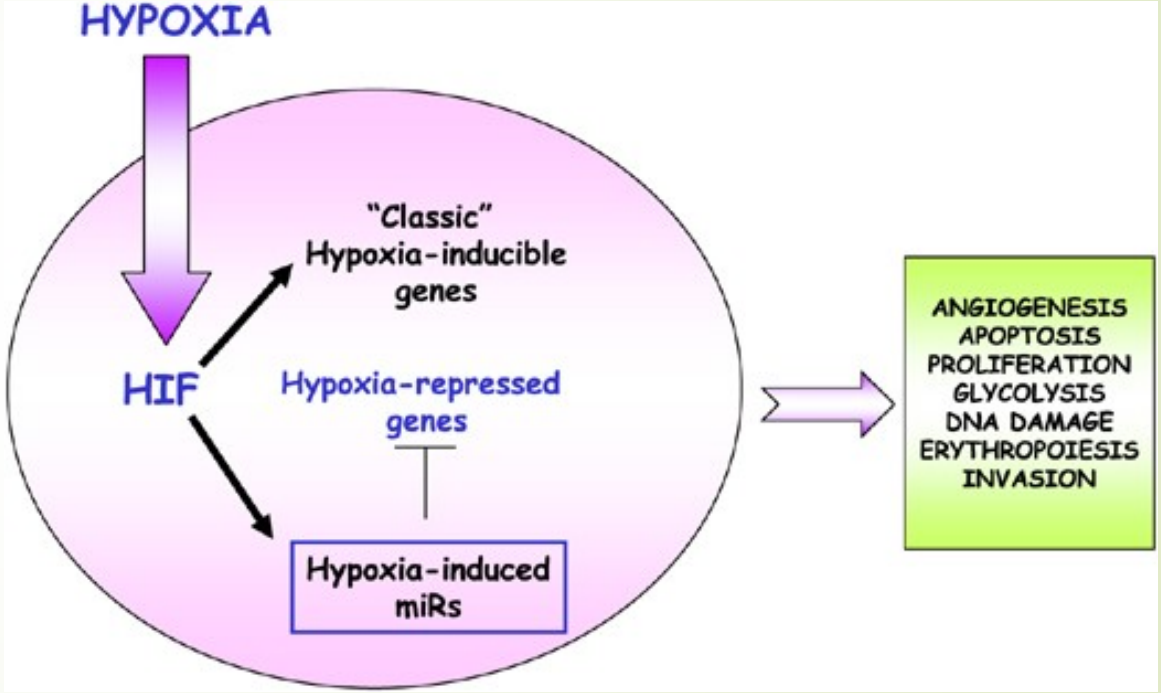

Fig15:R Kulshreshtha, R V Davuluri, G A Calin, M Ivan, A microRNA component of the hypoxic response, 15, pages667–671(2008).

Decessi causati da asfissia meccanica

Ruolo di miRNA-3185

- regolazione della via delle MAP chinasi;
- lega la regione 3' UTR del gene CYP4A11 inibendone la trascrizione.

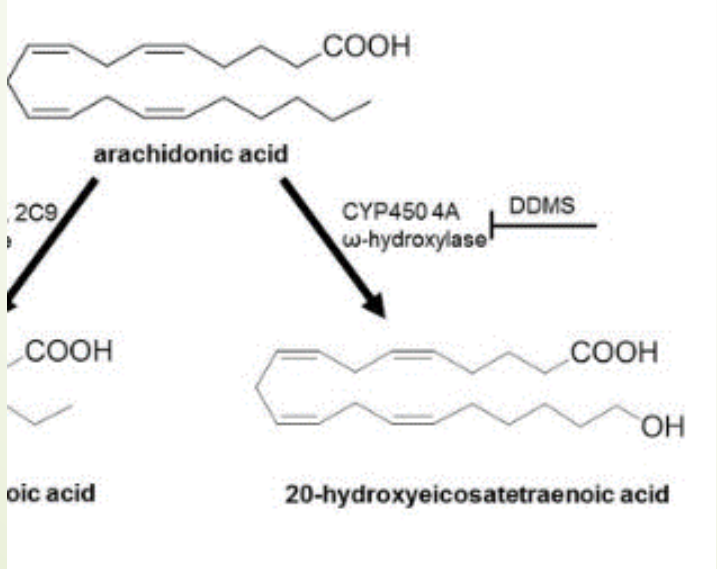

Fig16: https://www.researchgate.net

Ruolo di CYP4A11

- codifica per un enzima membro della superfamiglia dei citocromi P450;
- formazione del 20-HETE (acido 20-idrossieicosatretroenoico) a partire dall'acido arachidonico;
- La via CYP4A11-20-HETE induce HIF1-α nella risposta di neovascolarizzazione.

Riassunto della presentazione

L'asfissia meccanica è una delle principali cause di morte non naturale investigate dalla polizia scientifica. I più importanti marcatori dell'asfissia risultano i **micro-RNA**, una classe di piccoli RNA non codificanti implicati nella regolazione genica. Nell'articolo sono descritti studi che riguardano i cambiamenti nell'espressione di micro-RNA in risposta all'ipossia. I livelli di espressione del miRNA-3185 sono stati valutati tramite real time PCR e si è dimostrata una sovraespressione di questo miRNA nei casi di asfissia meccanica rispetto ad altre cause di decesso. Inoltre si è anche osservato che non c'è correlazione tra i cambiamenti di espressione e l'età, la temperatura e l'intervallo postmortem. Successivamente si è identificato il gene target: CYP4A11 grazie a database specifici, western blot e saggio dell'attività della luciferasi. Questo gene è stato sottoposto ad analisi funzionale e si è scoperta la sua implicazione in numerosi processi legati all'ossigeno che lo rendono un gene fondamentale per l'organismo nella risposta all'ipossia. I risultati ottenuti da questo studio dimostrano l'importanza dell'asse miRNA-3185/CYP4A11 per identificare i casi di asfissia meccanica.

Bibliografia

- **Liujun H., Heng Z., Yan Z., Yehui L., Li T., Jianlong M., Hongmei Xu, Kaijun M., Qun S., Bi X., Long Chen, Identification of the miRNA-3185/CYP4A11 axis in cardiac tissue as a biomarker for mechanical asphyxia, Forensic Science International, 311 (2020) 110293**;
- D. Azmak, Asphyxial deaths: a retrospective study and review of the literature, Am. J. Forensic Med. Pathol. 27 (2006) 134;
- M.R. Fabian, N. Sonenberg, W. Filipowicz, Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs, Annu. Rev. Biochem. 79 (2010) 351-379;
- Zhang H., Zhang P., MaK.-J. Lv Y.H. Li W.C., Luo C.L., Li L.L., Shen Y.W., He M., Jiang J.Q., Chen L., The selection of endogenous genes in human postmortem tissues, Sci. Just. J. Forensic Sci. Soc. 53 (2013) 115-120;
- UniProt CT, UniProt: the universal protein knowledgedatabase, Nucleic Acids Res. 46 (2018) 2699;
- Y. Ito, A. Ahmad, E. Kewley, R.J. Mason, Hypoxia-inducible factor regulates the expression of surfactant protein in alveolar type II cells in vitro, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 45 (2011) 938-945;
- J.T. Whelan, S.E. Hollis, D.S. Cha, A.S. Asch, M.H. Lee, Post-transcriptional regulation of the Ras-ERK/MAPK signaling pathway, J. Cell. Physiol. 227 (2012) 1235 – 1241;
- L. Chen, R. Ackerman, M. Saleh, K.H. Gotlinger, M. Kessler, L.G. Mendelowitz, J.R. Falck, A.S. Arbab, A.G. Scicli, M.L. Schwartzman, J. Yang, A.M. Guo, 20-HETE regulates the angiogenic functions of human endothelial progenitor cells and contributes to angiogenesis in vivo, J. Pharmacol. Exp. Ther. 348 (2014) 442-451 .

Immagini

- www.thermofisher.com;
- Royalty Free Muscular Contraction Clip Art, Vector Images;
- How it Works: Real Time PCR | The Scientist Magazine;
- Western Blotting Products and Resources: Novus Biologicals;
- Levine, Krehbiel, Berenson Statistica, Casa editrice: Pearson;
- pMIR-REPORT™ miRNA Expression Reporter Vector System;
- **https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110293**;
- R Kulshreshtha, R V Davuluri, G A Calin, M Ivan, A microRNA component of the hypoxic response, 15, pages667–671(2008).
- https://www.researchgate.net/figure