



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

**Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e  
Applicata**

---

*Analisi del miRNoma in pazienti affetti da psoriasi in  
trattamento con anti-IL-23*

*miRNome analysis in patients with psoriasis in treatment  
with anti-IL-23*

Tesi di Laurea Magistrale  
di:

**Marta Ojetti**

Relatore:

Chiar.mo Prof.ssa

**Fabiola Olivieri**

Correlatore:

Dott.ssa

**Giulia Maticchione**

**Sessione straordinaria**

**Anno accademico 2021/2022**

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1 La psoriasi</b> .....	<b>4</b>
1.1.1 <i>Caratteristiche generali</i> .....	4
1.1.2 <i>Patogenesi</i> .....	5
1.1.3 <i>Classificazione e clinica</i> .....	6
1.1.4 <i>Terapia</i> .....	9
<b>1.2 Il processo infiammatorio nella psoriasi</b> .....	<b>12</b>
<b>1.3 Regolazione epigenetica dei processi infiammatori: i microRNA</b> .....	<b>14</b>
1.3.1 <i>Biogenesi dei miRNA</i> .....	16
1.3.2 <i>Meccanismo d'azione dei miRNA</i> .....	17
1.3.3 <i>I miRNA e la psoriasi</i> .....	18
<b>1.4 Le cellule T regolatorie (Treg)</b> .....	<b>20</b>
<b>2. SCOPO DELLA TESI</b> .....	<b>24</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1 Caratteristiche della popolazione in studio</b> .....	<b>25</b>
<b>3.2 Estrazione dell'RNA totale da sangue intero</b> .....	<b>27</b>
<b>3.3 Retrotrascrizione degli mRNA</b> .....	<b>29</b>
<b>3.4 Real Time-PCR</b> .....	<b>32</b>
3.4.1 <i>Analisi dei dati</i> .....	34
<b>3.5 Analisi del miRNoma tramite tecnologia Next Generation Sequencing (NGS)</b> .....	<b>34</b>
<b>3.6 Analisi dei Treg con citofluorimetro</b> .....	<b>37</b>
<b>3.7 Analisi statistica</b> .....	<b>40</b>
<b>4. RISULTATI</b> .....	<b>41</b>
<b>4.1 Caratteristiche dei pazienti</b> .....	<b>41</b>
4.1.1. <i>Confronto di PASI, BSA, PGA, DLQI pre e post-trattamento</i> .....	42
<b>4.2 Analisi dell'espressione genica della citochina pro-infiammatoria IL-1<math>\beta</math> e della popolazione di linfociti Treg nel sangue intero dei pazienti psoriasici prima e dopo trattamento con risankizumab</b> .....	<b>43</b>
<b>4.3 Analisi del miRNoma da plasma di pazienti psoriasici in trattamento con risankizumab</b> .....	<b>45</b>
4.3.1 <i>Identificazione ed analisi dei target predetti per il cluster di miRNA upregolati e downregolati</i> .....	47

<i>4.4 Studio delle correlazioni tra i parametri acquisiti nei pazienti prima del trattamento con risankizumab</i> .....	52
<b>5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b> .....	<b>54</b>
<b>6. Bibliografia</b> .....	<b>58</b>
<b>7. Ringraziamenti</b> .....	<b>66</b>

## Capitolo primo

### INTRODUZIONE

#### *1.1 La psoriasi*

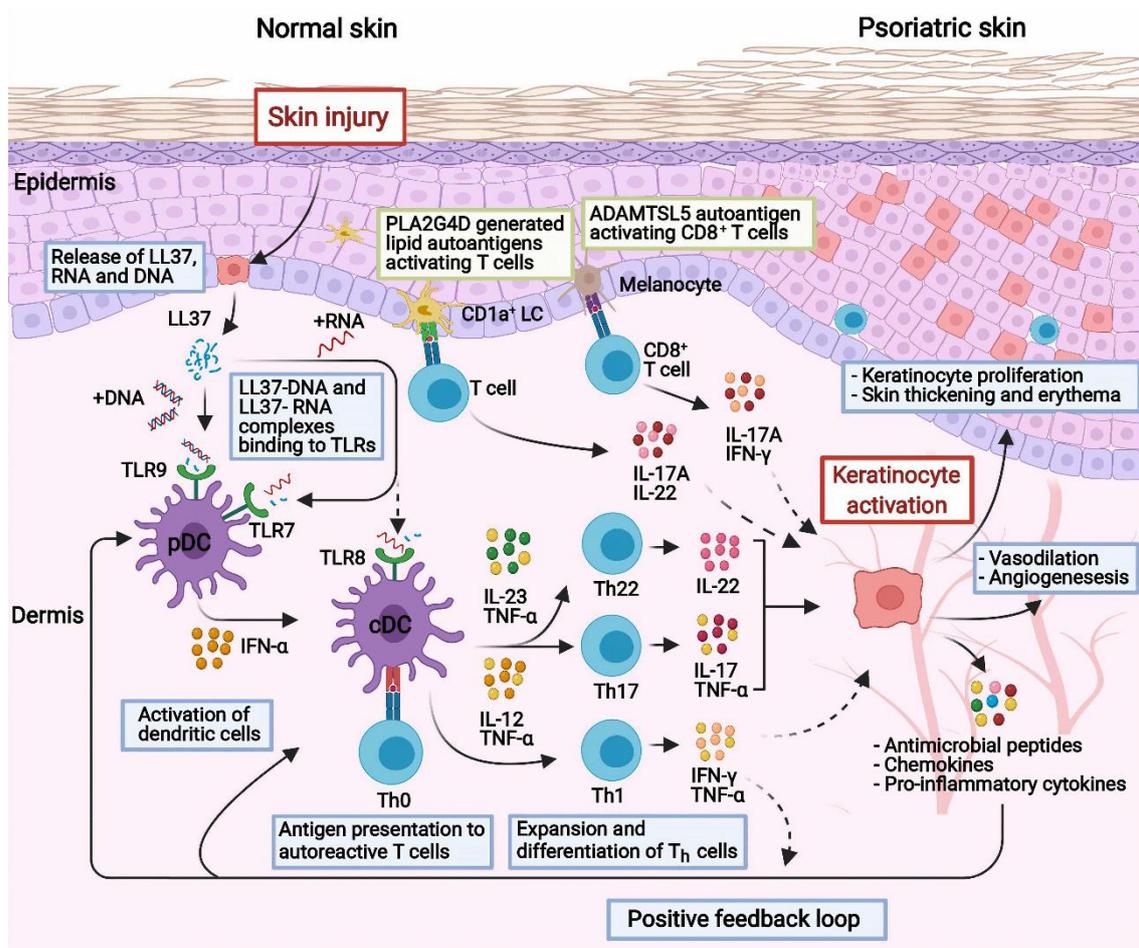
##### *1.1.1 Caratteristiche generali*

La psoriasi è una malattia infiammatoria cronica immuno-mediata che colpisce il 2-3% della popolazione mondiale (1). È una patologia ad eziologia multifattoriale, determinata da fattori di rischio genetici che si manifestano clinicamente in associazione con fattori ambientali scatenanti, quali intenso stress psico-fisico, interventi chirurgici, infezioni, abitudine al fumo o all'alcol, e l'utilizzo di alcune tipologie di farmaci. Le principali variazioni genetiche associate alla malattia si identificano in polimorfismi a singolo nucleotide (SNIP) in sequenze geniche coinvolte nella regolazione della risposta immunitaria. Ad oggi sono state identificate circa 40 regioni dell'intero genoma umano associate al rischio di sviluppare psoriasi (2). La forma più comune della patologia, detta *psoriasi volgare* o *a placche*, è caratterizzata dalla comparsa di placche eritematose argentee sulla superficie della pelle in diverse regioni del corpo, principalmente ginocchia, gomiti, tronco e cuoio capelluto. Inoltre, come altre malattie infiammatorie immuno-mediate, viene associata a diverse comorbidità, come artrite psoriasica, disturbi metabolici e malattie cardiovascolari. Tali manifestazioni cliniche sono il risultato di una infiammazione cronica persistente con periodi di esacerbazione che determina un'alterata proliferazione e differenziazione di cheratinociti ed un'infiltrazione a livello del derma e dell'epidermide di cellule effettrici immunitarie (3), che inducono una aumentata produzione di citochine.

### *1.1.2 Patogenesi*

La psoriasi è definita come un disturbo multisistemico, caratterizzato da uno stato infiammatorio generalizzato con manifestazione evidente e prevalente a livello della cute. Tale infiammazione è innescata e mantenuta da una complessa alterazione del sistema immunitario, in particolare dei linfociti T. La patogenesi della malattia può essere descritta distinguendo una fase iniziale, causata dall'interazione tra molteplici fattori di rischio genetici e ambientali, e una fase di mantenimento, caratterizzata da una progressione clinica cronica (1, 4). È noto che un ruolo fondamentale all'esordio della patologia è svolto dalle cellule dendritiche. In corrispondenza della lesione cutanea, i cheratinociti producono grandi quantità di peptidi antimicrobici (AMP) in grado di stimolare i recettori Toll-like (TLR) delle cellule dendritiche plasmacitoidi (pDc), particolari cellule dell'immunità innata che mediano la presentazione di antigeni alle cellule dell'immunità adattiva. L'attivazione del pDC comporta il rilascio di IFN- $\alpha/\beta$ , fattori che promuovono la maturazione delle cellule dendritiche mieloidi (mDC) (4). Queste cellule iniziano a produrre molecole fondamentali per lo sviluppo della malattia, che costituiscono anche dei target terapeutici: TNF- $\alpha$ , IL-23 e IL-12 (1). Si innesca così la fase di mantenimento dell'infiammazione psoriasica, caratterizzata da una risposta immunitaria adattativa con protagonisti diversi gruppi di linfociti T (4). Il TNF- $\alpha$  stimola la proliferazione e la differenziazione dei linfociti T, Th1, Th17 e Th22 (1). IL-23 promuove la differenziazione delle cellule Th17 e Th22, mentre IL-12 promuove le cellule Th1. Le cellule Th22 e Th17 attivate secernono TNF- $\alpha$ , IL-17 e IL-22, che stimolano i cheratinociti a proliferare e produrre peptidi antimicrobici, chemochine e citochine infiammatorie, come IL-17, un ulteriore target terapeutico. Conseguentemente si assiste all'instaurarsi di un ciclo a feedback positivo, che porta al mantenimento del processo infiammatorio in corso e allo sviluppo del fenotipo della psoriasi (1, 5). Sebbene la

patogenesi della malattia non sia ancora del tutto chiarita, diversi studi suggeriscono che possa avere un ruolo chiave anche la disfunzione delle cellule T regolatorie (Treg) e l'alterazione dell'equilibrio tra esse e cellule T effettrici iperattivate (Th1, Th2 e Th17). I Treg sono una sottopopolazione di linfociti T in grado di preservare l'equilibrio e l'omeostasi immunitaria, giocando un ruolo fondamentale di immunosoppressione (1) (figura 1).



**Figura 1.** Schema del meccanismo di patogenesi nella psoriasi.

### 1.1.3 Classificazione e clinica

L'esordio della psoriasi può avvenire a qualsiasi età, con caratteristiche che variano da paziente a paziente. Le manifestazioni dermatologiche che la caratterizzano riflettono i

meccanismi patogenetici di infiammazione, iperproliferazione e angiogenesi che sono alla base della malattia (6). La gravità della malattia è descritta in base a diversi parametri, che permettono di classificare la malattia come lieve, moderata e grave.

I principali indicatori clinici comprendono:

- l'indice di gravità ed estensione della psoriasi, PASI (Psoriasis Area Severity Index). Tiene conto della percentuale delle aree del corpo colpite dalla malattia e dall'eritema, dallo spessore e dalla desquamazione delle placche; è l'indice più significativo per valutare la gravità della malattia. Un PASI maggiore di dieci definisce una psoriasi moderata-severa;
- superficie corporea coinvolta, BSA (Body Surface Area), espressa in valore percentuale. Valuta l'estensione della manifestazione cutanea e un BSA maggiore di dieci definisce una psoriasi moderata-severa (7);
- PGA (Physician Global Assessment), valutazione media di tutte le lesioni psoriasiche. Non quantifica la superficie corporea colpita né valuta le posizioni delle singole manifestazioni cutanee. Ne esistono diverse forme, che generalmente corrispondono ad un punteggio pari a tre o superiore nelle forme psoriasiche di gravità moderata-severa e pari a zero o uno nelle forme lievi o trattate con successo (8);
- DLQI (Dermatologia Life Quality index), il più comune indicatore per valutare l'impatto della malattia sulla qualità della vita correlata alla salute e alle attività quotidiane (9). Può essere utilizzato per tutte le malattie della pelle, consentendo il confronto tra di loro. Consiste di dieci quesiti che indagano su sintomi e sensazioni,

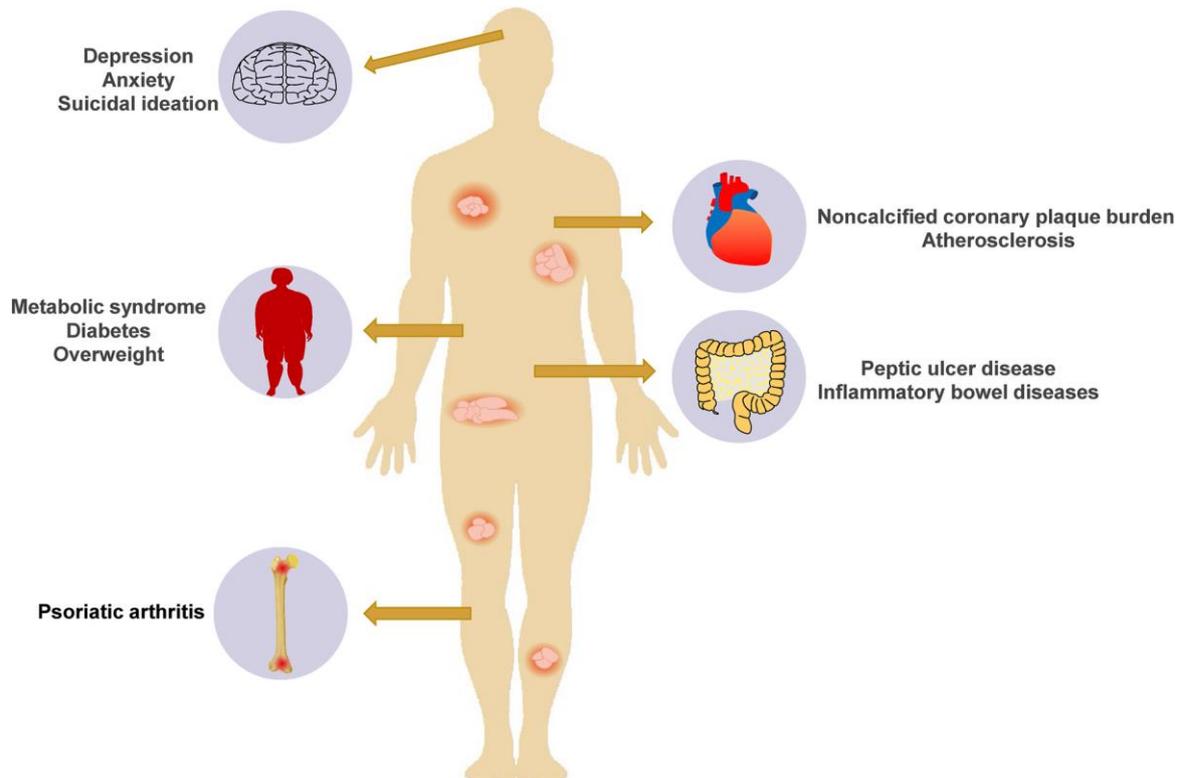
capacità di compiere le attività quotidiane sia nel campo del lavoro/scuola che nel tempo libero, la capacità di mantenere relazioni personali e sociali ed anche eventuali effetti collaterali del trattamento nei pazienti. Il punteggio totale risultante dal questionario è compreso tra zero e trenta, dove punteggi più alti indicano una maggiore compromissione della qualità della vita. (10).

Non esiste una classificazione unificata per lo spettro clinico psoriasico, per cui è possibile adottare approcci differenti di valutazione. A seconda della morfologia delle lesioni, si distinguono cinque sottotipi differenti di psoriasi:

- Psoriasi volgare, la più diffusa, con placche distribuite soprattutto simmetricamente soprattutto su gomiti e ginocchia e sul cuoio capelluto;
- Psoriasi guttata, con lesioni arrotondate “a goccia” frequenti in bambini e adolescenti a seguito di infezioni;
- Psoriasi pustolosa, con molteplici pustole sterili diffuse in forma generalizzata o localizzata;
- Psoriasi inversa, con lesioni diffuse sulle superfici flessorie e nelle pieghe cutanee;
- Psoriasi eritrodermica, con un eritema generalizzato sulla maggior parte della superficie corporea (11).

È importante sottolineare come la patologia non interessi unicamente il distretto cutaneo, configurandosi come malattia infiammatoria sistemica. Essa si associa, quindi, a numerose comorbidità che possono manifestarsi prima, contemporaneamente o in sequenza (**figura 2**). Le principali complicanze sistemiche comprendono depressione, (con forte ansia e fino a tendenza al suicidio), malattie cardiovascolari, aterosclerosi, sindrome metabolica,

diabete, obesità, ulcera peptica o malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI), malattia infiammatoria intestinale e artrite psoriasica (12).



**Figura 2.** Comorbidità associate alla psoriasi.

#### *1.1.4 Terapia*

Negli ultimi decenni, gli studi sulla patogenesi della psoriasi si sono concentrati sullo sviluppo di terapie mirate e altamente efficaci. Sebbene attualmente non esista un trattamento definitivo per la patologia, esistono terapie che ne permettono una remissione completa, anche se temporanea (12). La scelta della terapia adatta da parte del clinico è determinata dalla gravità della malattia, seguendo le linee guida nazionali ed internazionali. Esistono tre categorie principali di terapie disponibili per il trattamento della psoriasi a placche: terapie topiche, fototerapia e terapie sistemiche. (13). Nelle forme di psoriasi da lieve a moderata può risultare sufficiente un trattamento topico delle lesioni attraverso

l'utilizzo in associazione di glucocorticoidi e analoghi della vitamina D o di fototerapia. Viceversa, forme di psoriasi da moderata a grave richiedono spesso un trattamento sistemico (4).

### **Terapia topica**

I glucocorticoidi sono una famiglia di corticosteroidi, ormoni steroidei sintetizzati dalla corteccia del surrene che agiscono a livello del metabolismo del glucosio. Il meccanismo d'azione di questi ormoni è implicato nella regolazione della trascrizione di numerosi geni, in particolare quelli per le citochine proinfiammatorie. Gli effetti degli steroidi topici, presenti in varie formulazioni, dosaggi e combinazioni, sono di tipo antinfiammatorio, antiproliferativo, immunosoppressivo e vasocostrittore, permettendo un rapido controllo dei sintomi ed una diminuzione efficace del prurito nei pazienti (13, 14).

La vitamina D diminuisce la sintesi del DNA e riduce l'iperproliferazione dei cheratinociti. Per la loro minor irritabilità, è preferibile utilizzare come trattamento topico della malattia analoghi sintetici della vitamina D, quali il Calcipotriolo, un metabolita attivo della vitamina D, e il Calcipotriene (13). Si ritiene che il meccanismo d'azione di queste molecole nella psoriasi sia mediato dal loro legame ai recettori della vitamina D, che porta alla modulazione della proliferazione e differenziazione dei cheratinociti (14). Diversi studi hanno dimostrato come gli analoghi della vitamina D siano i più efficaci agenti topici, ad eccezione dei corticosteroidi più potenti (15).

### **Fototerapia**

La fototerapia viene utilizzata nei pazienti in cui l'estensione della superficie corporea coinvolta è elevata e la terapia topica con creme o unguenti non è praticabile (13). Le

radiazioni ultraviolette sono in grado di limitare localmente l'iperproliferazione epidermica, di indurre l'apoptosi selettiva dei linfociti T patogenici e di modulare positivamente i livelli delle cellule T regolatorie (16). Grazie ai suoi vantaggi in termini di efficacia e sicurezza, la fototerapia è spesso considerata come trattamento d'elezione, adatta a quasi tutti i pazienti (17).

### **Terapia sistemica**

I trattamenti tradizionali della terapia sistemica prevedono l'assunzione per via orale di farmaci quali la ciclosporina, l'acitretina, fumarati e il metotrexato (18). Queste molecole caratterizzano tradizionalmente la terapia sistemica, interagendo con diversi bersagli molecolari e mostrando un ampio spettro d'azione. Tuttavia, si sono dimostrati meno efficaci dei farmaci biologici sviluppati negli ultimi anni (12).

Con il miglioramento della comprensione della patogenesi della psoriasi, sono state sviluppate e approvate nuove molecole ingegnerizzate in grado di alterare specifici percorsi infiammatori. Tali farmaci, definiti farmaci biologici, comprendono anticorpi monoclonali e proteine chimeriche e vengono somministrati per via sottocutanea o per via endovenosa. Tra i principali bersagli di queste molecole si riconoscono TNF- $\alpha$ , IL-12/IL-23, IL-17A e IL-23 (4, 12).

#### *Risankizumab*

Risankizumab è un anticorpo monoclonale umanizzato che ha come target la subunità p19 dell'interleuchina 23 (IL-23). IL-23 è una citochina infiammatoria composta da due subunità, p40 e p19, che ricopre un ruolo chiave nella patogenesi della psoriasi (4). Essa viene prodotta nelle prime fasi della malattia insieme alla citochina IL-12 da parte delle

cellule dendritiche mieloidi (mDC). IL-12 è implicata nell'attivazione della risposta immunitaria Th1-dipendente, mentre IL-23 in quella Th17-dipendente, insieme a IL-6 e TGF $\beta$ . È importante notare che le due citochine condividono la stessa subunità p40 e appartengono alla stessa famiglia. Questa caratteristica è stata sfruttata, inizialmente, per sviluppare dei farmaci biologici indirizzati alla subunità condivisa p40, impedendo l'interazione delle due citochine con i recettori di superficie dei linfociti Th1 e Th17 e la conseguente attivazione delle rispettive vie infiammatorie. (13). Successivamente, lo sviluppo di farmaci biologici inibitori specifici di IL-23, con target p19, ha permesso di ottenere risultati clinici di successo risparmiando la via di segnalazione di Th1(19). Gli inibitori dell'interleuchina IL-23 rappresentano la classe di farmaci biologici più recentemente approvata per il trattamento della psoriasi da moderata a grave (20). Grazie alle sue caratteristiche molecolari, tra cui l'elevata affinità per IL-23, risankizumab sembra avere un rapido effetto nella riduzione dei sintomi e dei segni della psoriasi, con un miglioramento della qualità della vita dei pazienti, anche nei soggetti che non rispondono ad altri farmaci biologici (21).

### ***1.2 Il processo infiammatorio nella psoriasi***

L'infiammazione è un meccanismo tipico dell'immunità innata che si instaura in risposta ad agenti patogeni e/o a danno tissutale di tipo chimico, fisico o biologico. L'infiammazione racchiude un insieme di processi biologici, caratterizzati dall'attività di differenti cellule con la finalità di difendere l'organismo da potenziali patogeni e permettere la riparazione dei danni tissutali in modo da ripristinare la normale funzionalità dell'organismo. È necessario, però, che l'attivazione dei meccanismi infiammatori sia temporanea e localizzata nel sito danneggiato, per evitare lo sviluppo di una risposta

difensiva caratterizzata da cronicizzazione che può avere una diffusione sistemica. Nella psoriasi, a lungo considerata una malattia esclusivamente cutanea, si assiste proprio alla persistenza di livelli elevati di mediatori immunitari, che instaurano così un'inflammatione sistemica cronica. I segnali di pericolo endogeni rilasciati dai cheratinociti in corrispondenza delle lesioni cutanee, rientrano in quella numerosa classe di molecole che prendono il nome di Damage-Associated Molecular Patterns (DAMP) e sono in grado di innescare la risposta infiammatoria. I DAMP condividono somiglianze strutturali e funzionali con i segnali di pericolo esogeni, i Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMP), che, come i DAMP, sono riconosciuti da una serie di recettori, chiamati recettori di riconoscimento dei patogeni (PRR). I recettori coinvolti nelle fasi iniziali del processo infiammatorio della psoriasi, si trovano a livello della membrana plasmatica delle cellule dendritiche o dei cheratinociti stessi e sono chiamati Toll-like receptors (TLR) (22). Dopo stimolazione, le cellule sono in grado di produrre una serie di citochine proinfiammatorie, come IFN- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-36, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-25 e CXCL-10, avviando una cascata di segnalazione che culmina con l'attivazione del fattore di trascrizione nucleare Kappa B (NF- $\kappa$ B) e la conseguente stimolazione di cellule che caratterizzano l'immunità adattiva (23). La via di segnalazione di NF- $\kappa$ B ricopre un ruolo centrale nel processo infiammatorio, poiché controlla l'espressione di citochine pro-infiammatorie e coordina la proliferazione e differenziazione cellulare. NF- $\kappa$ B è formato da cinque monomeri proteici (p65/RelA, RelB, cRel, p50 e p52) che formano omodimeri o eterodimeri capaci di legare il DNA (24). Normalmente, si trova nel citoplasma sequestrato dall'inibitore della molecola  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) ma, in presenza degli stimoli pro-infiammatori descritti in precedenza, la cascata di segnalazione porta all'attivazione della chinasi I $\kappa$ B (IKK). L'enzima è composto da due subunità catalitiche, IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ , e dalla subunità regolatrice modulatore essenziale di NF- $\kappa$ B

(NEMO) o IKK $\gamma$ . La fosforilazione del complesso di IKK, contenente NEMO, permette all'enzima di fosforilare a sua volta la chinasi I $\kappa$ B in corrispondenza di due serine all'estremità N-terminale della molecola, comportandone la successiva degradazione. Conseguentemente, si assiste al rilascio di NF- $\kappa$ B dall'inibitore citoplasmatico e alla sua traslocazione nel nucleo, per attivare la trascrizione di geni bersaglio, principalmente anti-apoptotici e pro-infiammatori (25). I messaggeri prodotti codificano in particolare per citochine, come IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ , in grado a loro volta di attivare NF- $\kappa$ B con un meccanismo a feedback positivo; oppure, per molecole in grado di attivare i linfociti T e B e permettere la coordinazione dell'immunità innata ed adattiva (26).

### ***1.3 Regolazione epigenetica dei processi infiammatori: i microRNA***

I microRNA (miRNA) sono molecole di RNA endogene di lunghezza pari a 19-25 nucleotidi, implicate nella regolazione dell'espressione genica post-trascrizionale di quasi tutti i geni umani (27, 28, 29). Sono molecole non codificanti poiché trascritte a partire dal DNA ma non tradotte in proteine e svolgono la loro funzione come molecole di RNA andando a modulare pathways fisiologici e patologici, tra cui la crescita e la differenziazione cellulare, il metabolismo, l'immunità, e numerose patologie umane (29). Vennero identificati per la prima volta nel 1993 nel nematode *Caenorhabditis elegans*, dove venne individuato un piccolo RNA, codificato dal locus lin-4, implicato nella regolazione del processo di sviluppo larvale (30). L'individuazione successiva di un RNA omologo nei mammiferi ha permesso di dimostrare un'elevata conservazione di queste molecole nel corso dell'evoluzione e di approfondire la ricerca sulla loro funzione. È stato dimostrato che le sequenze codificanti per i miRNA rappresentino circa l'1% del genoma umano, in parte raggruppate in cluster, in parte localizzate all'interno di sequenze introniche (31). Ad oggi,

attraverso analisi di sequenze genomiche o studi computazionali, sono stati individuati nell'uomo oltre 2500 miRNA differenti (32, 33), che sono elencati e descritti nel database disponibile online *miRBase* (<http://www.mirbase.org>). I rapidi progressi degli ultimi anni riguardo l'identificazione di nuovi miRNA sono stati sostenuti dallo sviluppo delle tecniche di sequenziamento di nuova generazione (Next Generation Sequencing), che hanno permesso di sequenziare in maniera abbastanza rapida tutto il DNA e l'RNA presenti in un dato campione.

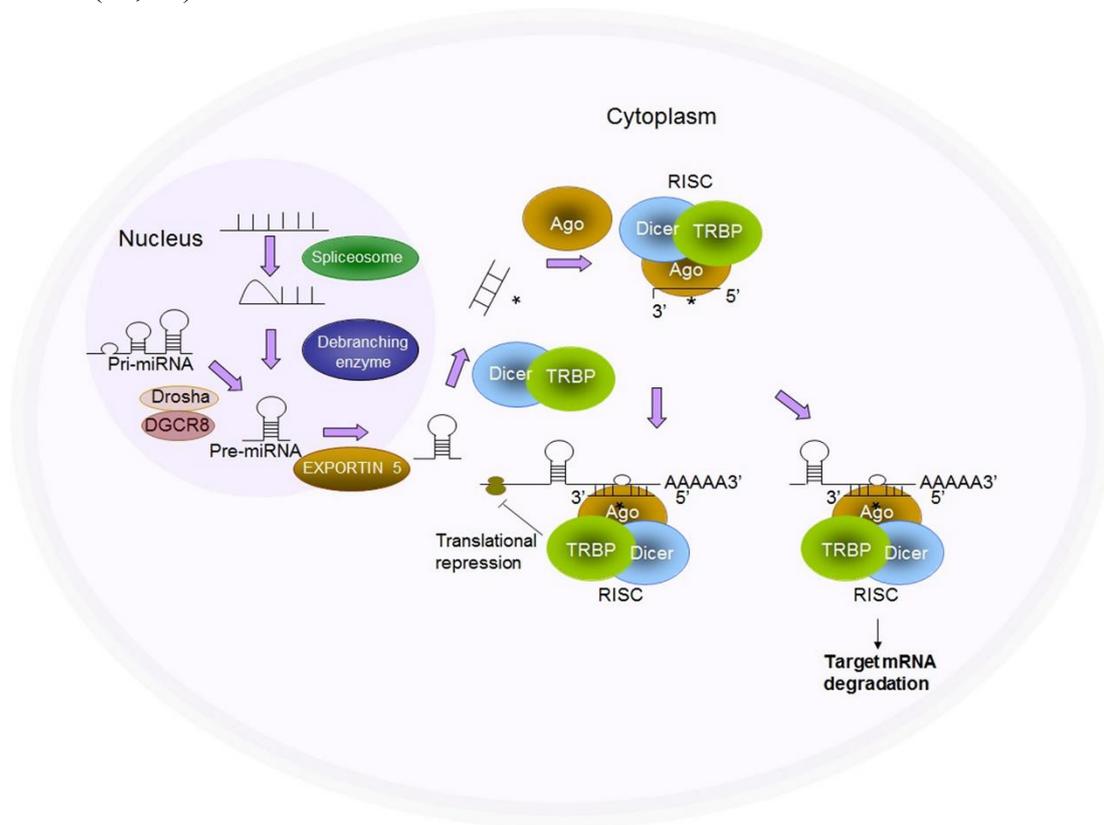
I miRNA sono sintetizzati all'interno delle cellule ma possono essere rilasciati all'esterno con meccanismi di rilascio passivo e attivo e ritrovarsi, quindi, nei fluidi corporei, inclusi plasma e siero (miRNA circolanti). In circolo i miRNA si associano con proteine o sono contenuti all'interno di vescicole, in modo da evitare che le RNasi presenti ne catalizzino la digestione e degradazione (34, 35). La deregolazione della sintesi e del rilascio di miRNA specifici in differenti contesti patologici, ha fatto sì che diventassero biomarcatori potenzialmente utili per la valutazione del rischio, per la diagnosi e la prognosi di diverse malattie (27). Alcune caratteristiche dei miRNA ne potrebbero agevolare un futuro utilizzo nella pratica clinica: possono essere quantificati nei prelievi di sangue periferico (prelievi non particolarmente invasivi); l'elevata tessuto-specificità; la buona sensibilità mostrata, modulandosi in risposta alla terapia o alla progressione della malattia; l'esistenza di numerose tecniche di rilevamento da differenti materiali di partenza e la possibilità di sviluppare nuovi test in tempi brevi e con costi contenuti (36). Conseguentemente, la ricerca ha indagato molto il ruolo dei miRNA come biomarcatori, mettendo in luce le loro potenzialità cliniche. Attualmente, è stato dimostrato che i miRNA circolanti, attraverso un semplice prelievo, possono contribuire a valutazioni diagnostico/prognostiche di diverse

patologie, tra cui malattie autoimmuni, malattie cardiovascolari, tumori, o per monitorare l'efficacia di un trattamento (27, 37).

### *1.3.1 Biogenesi dei miRNA*

Il processo di biogenesi dei miRNA ha inizio nel nucleo, dove i geni che codificano per i miRNA vengono trascritti dall'RNA polimerasi II, generando frammenti di RNA lunghi un centinaio di nucleotidi, i miRNA primari o pri-miRNA. Questi RNA immaturi presentano una caratteristica struttura a forcina (38) e sono bersaglio di un enzima RNasi III, Drosha, che li scinde per formare molecole più corte, i miRNA precursori intermedi o pre-miRNA. I pre-miRNA vengono traslocati dal nucleo nel citoplasma dal sistema shuttle GTP-dipendente mediato dall'Esportina 5. In questa sede vengono scissi da un altro enzima della famiglia delle RNasi III, l'enzima Dicer, in un miRNA duplex maturo di 22 nucleotidi. Successivamente, l'enzima interagisce con la proteina Ago per formare il complesso di silenziamento indotto dall'RNA (RISC) e rimane associato al miRNA maturo. Conseguentemente, i due filamenti del miRNA duplex vengono separati, generando il filamento guida e quello passeggero o miRNA\*: il primo rimane integrato nel complesso mentre il secondo viene degradato (39, 40). Nella maggioranza dei casi, sembra che la selezione del filamento guida da parte della proteina Ago si basi sulla stabilità dell'estremità 5' dei filamenti del duplex (41). In questa forma il filamento guida dei miRNA è in grado di riconoscere e legare l'estremità non codificante 3'UTR dell'mRNA bersaglio per complementarità e comportarne la repressione traduzionale o la degradazione (**figura 3**). È facile dedurre che un'alterazione di questo processo regolativo può causare un'espressione anormale di diverse citochine, con conseguente infiammazione e perdita di tolleranza

immunitaria agli autoantigeni, una caratteristica comune nelle malattie infiammatorie croniche (27, 42).



**Figura 3.** Biogenesi dei miRNA.

### 1.3.2 Meccanismo d'azione dei miRNA

L'azione principale dei miRNA maturi legati al RISC è quella di inibire l'espressione genica di un determinato target, causandone una ridotta sintesi proteica. Tale attività si manifesta generalmente attraverso l'appaiamento di una breve sequenza all'estremità 5' del miRNA, chiamata *seed sequence*, con la regione 3' non tradotta (UTR) dell'mRNA target, bloccandone la traduzione (38). Quest'interazione è essenziale per una corretta modulazione dell'espressione del bersaglio, nonostante possa avvenire con una complementarità incompleta, come spesso avviene negli animali, e non perfetta, come nelle piante (43). Studi approfonditi su questo riconoscimento hanno reso possibile, attraverso analisi

computazionali, la predizione dei potenziali messaggeri target per gli specifici miRNA (44). È stato dimostrato, così, che un singolo miRNA può legarsi a diversi mRNA e che diversi miRNA possono regolare in cooperazione uno stesso target. In questo modo i miRNA sono in grado di regolare simultaneamente più pathways e processi biologici, interagendo con molecole di RNA messaggero che codificano per proteine dello stesso pathway o di pathways diversi (27).

Tenendo conto del meccanismo d'azione generale, i miRNA potrebbero essere in grado di controllare la proliferazione, l'apoptosi o la differenziazione di cellule immunitarie e di cheratinociti, svolgere un ruolo centrale nella regolazione della risposta immunitaria nel contesto della psoriasi.

### *1.3.3 I miRNA e la psoriasi*

Nel 2007 è stata descritta per la prima volta un'espressione alterata di miRNA in pazienti affetti da psoriasi (42, 45). Successivamente numerosi studi hanno dimostrato che essi svolgono un ruolo fondamentale in diverse malattie infiammatorie croniche della pelle e che il profilo d'espressione di specifici miRNA si mostra differente in campioni di cute e plasma psoriasici rispetto alla condizione fisiologica (27). Recenti studi hanno dimostrato che circa 251 miRNA sono espressi differentemente nelle lesioni della psoriasi rispetto alla pelle sana, tra i quali 139 risultano espressi in quantità superiore rispetto al normale e 122 espressi in quantità inferiore rispetto alla condizione di normalità. Inoltre, gli mRNA bersaglio di questi miRNA, sembrano essere implicati in una ampia serie di pathways tutti associati alla psoriasi (46). È noto che l'iperproliferazione e l'aberrante differenziazione dei cheratinociti sono le caratteristiche patologiche fondamentali dell'epidermide psoriasica (47). Studi degli ultimi anni hanno dimostrato che gran parte dei miRNA differenzialmente

espressi nella malattia è associata proprio alla compromissione dell'equilibrio tra proliferazione e differenziazione di queste cellule. Inoltre, nonostante la patogenesi della psoriasi rimanga poco chiara, è stato dimostrato che lo squilibrio dei sottogruppi di cellule T CD4 + è un fattore patogeno critico, che coinvolge l'espansione delle cellule Th1 e Th17 e la disfunzione delle cellule Treg (48, 49, 50). Ad oggi, sono stati segnalati numerosi miRNA che regolano i destini e i comportamenti delle cellule T ma non è ancora del tutto chiaro quale di essi sia specificatamente associato a linfociti T CD4+ (42).

Tra i miRNA più frequentemente associati alla psoriasi, con diverse tendenze ad essere upregolati o downregolati, circolanti o espressi nei campioni di tessuto di pazienti psoriasici, vanno segnalati: miR-21, che mantiene lo stato infiammatorio cutaneo nei pazienti affetti da psoriasi; miR-31, che stimola la produzione di citochine infiammatorie e chemochine tramite TNF- $\alpha$ ; miR-146, che modula il pathway di NF-kB ed ha una marcata correlazione con l'espressione di IL-17; miR-155, che porta alla produzione di TNF- $\alpha$ ; miR-203, che induce la differenziazione epiteliale e sopprime le risposte immunitarie cutanee; miR-99, che inibisce la differenziazione dei cheratinociti; miR-125, che inibisce la proliferazione cellulare; miR-197, che riduce la proliferazione e la migrazione dei cheratinociti; miR-520, che sopprime la proliferazione dei cheratinociti (39, 51).

#### *Alterazione di miRNA a seguito di terapie per la psoriasi*

Studi degli ultimi anni hanno dimostrato una probabile modulazione di specifici miRNA correlati alla psoriasi nei pazienti sottoposti a terapie sistemiche. Ad esempio, la fototerapia sembra essere in grado di ridurre l'espressione del miR-21 nell'epidermide e incrementare l'espressione del miR-125b (52). Ancora, si registra una diminuzione dei miR-143 e miR-223 nelle cellule mononucleate del sangue periferico dei pazienti che hanno subito un

trattamento con metotrexato, rispetto alla condizione iniziale (53). Pivarcsi et al. hanno verificato un aumento di 38 miRNA nel siero di pazienti sottoposti a terapia con il farmaco biologico etanercept, risultato non raggiunto invece dalla terapia con metotrexato. In conclusione, è possibile notare una correlazione tra le terapie e cambiamenti nei livelli di miRNA in pazienti psoriasici. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi che chiariscano l'esatto ruolo dei miRNA nella psoriasi e che considerino la significativa variabilità interindividuale nella risposta terapeutica (54).

#### ***1.4 Le cellule T regolatorie (Treg)***

La patogenesi della psoriasi è principalmente guidata da linfociti T di tipo 1 e di tipo 17, i quali producono citochine e che in individui sani sono modulati dalle cellule T regolatorie (Treg). I Treg svolgono un ruolo fondamentale nell'omeostasi immunitaria e contribuiscono a prevenire le malattie autoimmuni, sopprimendo le risposte immunitarie. Nella psoriasi, i Treg sono compromessi nella loro funzione soppressiva, portando ad un'alterazione dell'equilibrio tra i linfociti T-helper 17 e i Treg stessi (2). I Treg sono caratterizzati dall'espressione del fattore di trascrizione Foxp3 e la maggior parte di essi risulta essere anche CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> (55). La loro funzione soppressiva si sviluppa attraverso diverse vie: interazione cellula-cellula, produzione di citochine soppressive come IL-10, TGF- $\beta$ 1 e IL-35 e azione citotossica diretta (56). In base alla loro origine, i Treg naturali possono essere suddivisi in Treg derivati dal timo (tTreg) e Treg perifericamente indotti (pTreg) (57). I Treg residenti nei tessuti sono popolazioni eterogenee che mostrano un adattamento tessuto-specifico strettamente collegato ai segnali ambientali e fisiologici che ricevono, sviluppando caratteristiche specifiche del proprio fenotipo, trascrittoma e metabolismo, che li distinguono dai Treg circolanti e da quelli localizzati in organi linfoidi secondari. (58, 59).

I Treg localizzati nel tessuto cutaneo modulano importanti processi della pelle, tra cui la guarigione delle ferite, la rigenerazione del follicolo pilifero e la tolleranza immunitaria adattativa ai commensali cutanei (60). Il ruolo dei Treg nella patologia psoriasica non è stato ancora del tutto chiarito. Il numero di Treg presenti in campioni cutanei e nel sangue dei pazienti sembra essere in relazione con la gravità della malattia. Diversi autori hanno riportato una percentuale ridotta di Treg nel sangue periferico di pazienti con psoriasi, la cui gravità delle condizioni è però risultata variabile (61); altri pazienti esaminati, invece, non hanno mostrato differenze nella percentuale di Treg circolanti (62). Per quanto riguarda l'infiltrazione di Treg nelle lesioni psoriasiche, la maggior parte degli studi ne dimostra una frequenza maggiore rispetto alla pelle sana (63). Zhang et al., ad esempio, hanno riferito che l'aumento dei Treg nella cute psoriasica sia correlata ai punteggi PASI in pazienti con malattia da moderata a grave (64). Inoltre, mentre Bovenschen et al. hanno osservato una maggiore frequenza di Treg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> nel derma rispetto all'epidermide nei pazienti con psoriasi a placche, Fujimura et al. hanno riportato il contrario (63, 65). Questi risultati contrastanti possono essere una conseguenza dei differenti stati della malattia, della diversa definizione di Treg, dei siti di biopsia dalle placche psoriasiche e dei sottotipi di psoriasi studiati. Rimane comunque evidente che i Treg concorrano attivamente alla patogenesi della psoriasi.

Studi recenti indicano che la maggior parte dei pazienti con psoriasi sia caratterizzata dall'alterazione delle funzionalità dei Treg, isolati sia dalle lesioni cutanee che da sangue periferico (66). La funzione soppressiva dei Treg potrebbe essere compromessa dall'ambiente delle citochine pro-infiammatorie delle lesioni, come ad esempio dagli alti livelli di IL-6 (67). Ulteriormente, l'inibizione di Foxp3, operata dal miR-210 sovraespresso nelle cellule T CD4<sup>+</sup>, sembra causare la diminuzione dei livelli delle citochine soppressive

IL-10 e TGF- $\beta$  e l'aumento dei livelli delle citochine pro-infiammatorie IFN- $\gamma$  e IL-17A, dimostrando come anche la sovraespressione di miR-210 contribuisca alla disfunzione dei Treg (68).

Le cellule Th17 sono un sottoinsieme di cellule T CD4+ che secernono un profilo caratteristico di citochine, tra cui IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22. Svolgono un ruolo importante nell'immunità ai patogeni extracellulari e nella patogenesi di malattie infiammatorie e autoimmuni, compresa la psoriasi (69, 70). In questa malattia, le cellule altamente attivate si infiltrano nelle lesioni psoriasiche, una volta polarizzate dai livelli elevati di citochina IL-23 (71, 72.). I Treg e le cellule Th17 condividono l'espressione di TGF- $\beta$  per il differenziamento dal loro comune precursore, la cellula T naïve, risultando in una costante competizione evolutiva (73). Nella psoriasi è stata notata un'alterazione dell'equilibrio esistente nella cute del rapporto tra Th17 e Treg. Zhang et al. hanno mostrato livelli elevati sia di cellule Th17 che di Treg nel sangue periferico e nella cute lesionale dei pazienti. Inoltre, la variazione del rapporto tra cellule Th17 e Treg nelle lesioni cutanee è risultata esattamente l'opposto di quanto osservato nel sangue periferico, suggerendo un probabile reclutamento di Treg nei siti di lesione per inibire la risposta iperimmune nell'infiammazione. (74).

Molti trattamenti attuali o futuri per la psoriasi sembrano avere come target il numero e la funzionalità dei Treg. Fototerapia e farmaci biologici, come anti-IL-17 o anti-IL-23, possono, almeno in parte, salvaguardare la funzione soppressiva dei Treg. L'equilibrio tra cellule Th17 e Treg, invece, sembra essere ripristinato attraverso diversi meccanismi, ad esempio: l'induzione di Treg, tramite anti-TNF- $\alpha$ , anti-IL-23 o fototerapia; la

sottoregolazione delle cellule Th17, tramite fototerapia o anti-IL-17; l'inibizione della plasticità dei Treg, tramite anti-IL-23 (75, 76) (figura 4).

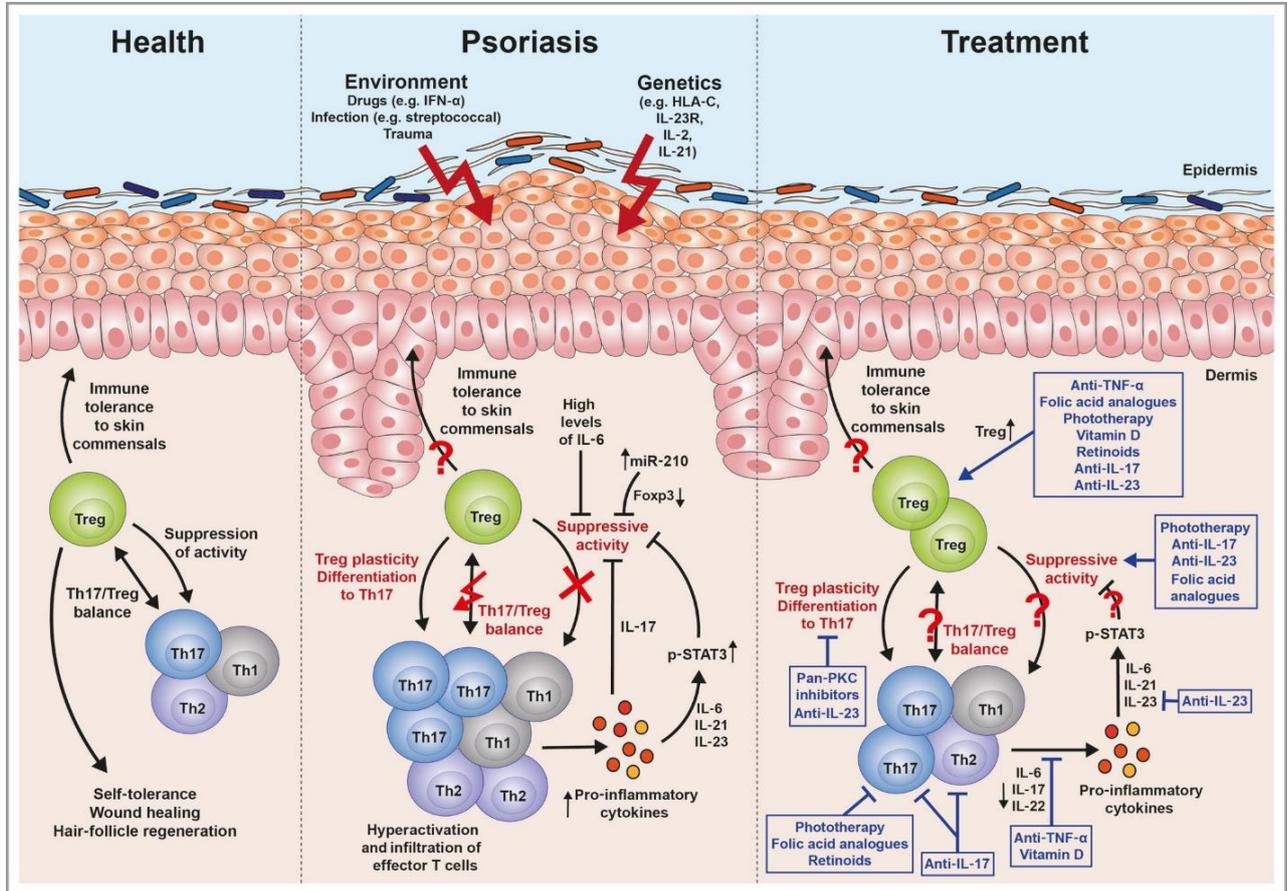


Figura 4. Le cellule T regolatorie nella psoriasi.

## **Capitolo secondo**

### **SCOPO DELLA TESI**

La psoriasi è una malattia infiammatoria immuno-mediata supportata da una infiammazione sostenuta e caratterizzata da un'alterata proliferazione e differenziazione di cheratinociti e dall'infiltrazione di cellule immunitarie nel tessuto cutaneo. Negli ultimi anni è stato ampiamente discusso il ruolo dei miRNA nella patogenesi della malattia, suggerendo che i miRNA che modulano la risposta infiammatoria potrebbero essere coinvolti nell'eterogeneità delle caratteristiche psoriasiche e nelle risposte ai trattamenti. Di conseguenza, l'analisi dei livelli di miRNA potrebbe costituire un approccio innovativo per esplorare l'efficacia clinica delle terapie antinfiammatorie nei pazienti affetti da psoriasi.

Inoltre, è noto che la terapia biologica con risankizumab, un anticorpo monoclonale anti-IL-23, risulta efficace per il trattamento della psoriasi. Ad oggi, però, non ci sono studi che valutino la modulazione dei miRNA circolanti in relazione alla risposta individuale alla terapia anti-IL-23.

Scopo di questa tesi è quindi l'identificazione, tramite tecnologie di sequenziamento NGS, dei miRNA circolanti significativamente modulati in seguito al trattamento con risankizumab in pazienti affetti da psoriasi.

Inoltre, poiché la patogenesi della psoriasi sembra caratterizzata dall'alterazione della funzionalità delle cellule T regolatorie e della loro frequenza, scopo ulteriore di questa tesi è valutare come varia la popolazione di Treg prima e dopo la terapia biologica con farmaco anti-IL-23.

## Capitolo terzo

### MATERIALI E METODI

#### *3.1 Caratteristiche della popolazione in studio*

Nel periodo tra gennaio 2021 e luglio 2022 sono stati selezionati 12 soggetti affetti da psoriasi a placche moderata-severa presso la Clinica di Dermatologia dell'Università Politecnica delle Marche (UNIVPM)- Azienda Ospedaliera “Ospedali Riuniti delle Marche”. Le caratteristiche basali (T0) dei pazienti in studio sono riassunte nella **tabella 1**.

I pazienti sono stati sottoposti a screening per HBV, HCV, HIV, TBC, come raccomandato da linee guida (7). È stato quindi effettuato l'esame obiettivo e la valutazione della severità di malattia utilizzando i parametri: PASI (Psoriasis Area Severity Index), BSA (Body Surface Area), PGA (Physician Global Assessment), DLQI (Dermatology Life Quality index).

I criteri di inclusione adottati sono stati:

- Pazienti di età superiore ai 18 anni, affetti da psoriasi a placche da moderata a severa secondo le linee guida nazionali e internazionali (7);
- Pazienti che non hanno ricevuto alcun trattamento locale o sistemico con corticosteroidi o terapia immunosoppressiva un mese prima dell'arruolamento;
- Pazienti idonei alla terapia biologica con agenti anti-IL-23.

I criteri di esclusione sono stati:

- Pazienti affetti da gravi malattie cardiovascolari, cerebrovascolari, epatiche, renali ed ematopoietiche;

- Pazienti in gravidanza o in allattamento;
- Pazienti non conformi per altre valutazioni cliniche.

I pazienti sono stati sottoposti a terapia biologica con risankizumab. La somministrazione del trattamento è avvenuta attraverso due iniezioni da 75 mg di risankizumab per via sottocutanea alla settimana 0, dopo 4 settimane e ogni 12 settimane. Successivamente, i pazienti sono stati sottoposti a follow-up mensile per la valutazione clinica e la valutazione di eventuali eventi avversi e rivalutati a un anno (T1) dalla prima somministrazione.

Da tutti i 12 pazienti sono stati raccolti campioni di sangue prima e dopo l'inizio della terapia con risankizumab attraverso un prelievo ematico in provette contenenti anticoagulanti (5 ml di siero in citrato e 5 ml in EDTA per plasma e sangue intero).

Il comitato etico dell'UNIVPM ha approvato il protocollo di studio e tutti i partecipanti arruolati hanno fornito il consenso informato scritto.

**Tabella 1.** Caratteristiche generali della popolazione di studio.

<b>Variabili</b>	<b>N=12</b>
<b>Età (anni) - m (DS)</b>	44.9 ±12.5
<b>Genere (M) - n (%)</b>	9 (75)
<b>Peso (kg) - m (DS)</b>	83.3±16.6
<b>BMI (kg/m2) - m (DS)</b>	27.3 (5.1)
<b>Fumatori – n (%)</b>	6 (50)
<b>Comorbidità – n (%)</b>	
Dislipidemia	2 (16.7)
Ipertensione	1 (8.3)
Diabete mellito di tipo II	1 (8.3)
Atopia	1 (8.3)
Disordini ansioso- depressivi	1 (8.3)
Tiroidite	2 (16.7)
<b>Età d'insorgenza della psoriasi (anni) – m (DS)</b>	29.3 ± 15.1 (10-64)
<b>Durata della psoriasi (anni) m (DS)</b>	15.6 ± 14 (1-46)

<b>Familiarità della psoriasi n (%)</b>	3 (25)
<b>Pazienti con sedi speciali coinvolte n (%)</b>	10 (83.3)
Due o più sedi	
Lesioni sul volto	3 (25)
Lesioni palmoplantari	2 (16.7)
Lesioni al cuoio capelluto	3 (25)
Lesioni genitali	7 (58.3)
	2 (25)
<b>Trattamenti biologici precedenti n (%)</b>	
No	
Si	10 (83.3)
1	2 (16.7)
2	1 (8.3)
3 o più	0
	1 (8.3)
<b>PASI m (DS)</b>	19.9 ± 14.8 (3- 33.2)
<b>BSA m (%) (DS)</b>	27.8 ± 0.2 (3- 75)
<b>PGA m (DS)</b>	3.3 ± 0.5 (3-4)
<b>DLQI m (DS)</b>	7.1 ± 3.6 (2- 15)

### ***3.2 Estrazione dell'RNA totale da sangue intero***

Per la valutazione dell'espressione degli mRNA di specifiche citochine in circolo è stato necessario effettuare l'estrazione ed isolamento dell'RNA totale da campioni di sangue intero dei pazienti selezionati.

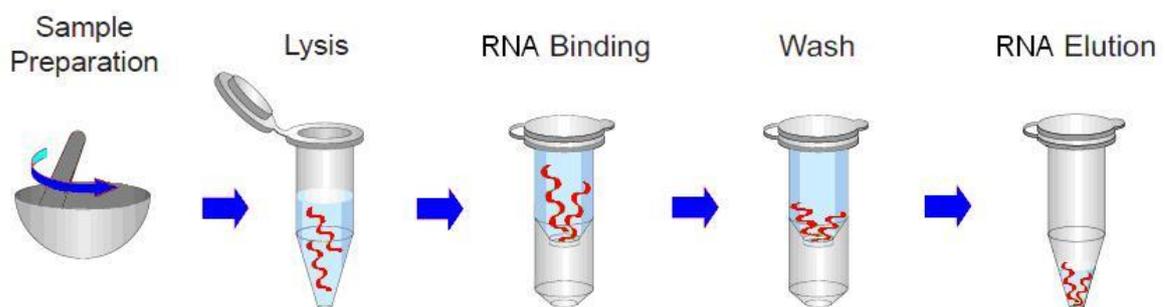
L'RNA totale è stato isolato da 50 µl di sangue intero utilizzando il Total RNA Purification Kit della Norgen Biotek Corporation (#37500, Thorold, ON, Canada). Il kit prevede l'utilizzo di colonne cromatografiche a scambio ionico, composte di una resina matrice di separazione per il legame dell'RNA. Il legame permette l'isolamento dell'RNA dalle altre componenti presenti nel sangue. La procedura viene eseguita a temperatura ambiente, con guanti, puntali con filtro e plastica RNasi-free per evitare possibili contaminazioni da RNasi in grado di degradare o danneggiare l'RNA. Le Eppendorf utilizzate durante la procedura ma non contenute nel kit devono subire precedentemente sterilizzazione in autoclave. Le fasi

principali di estrazione e purificazione prevedono: la preparazione del lisato, da effettuare in ghiaccio; il legame dell'RNA alla colonna cromatografica; il lavaggio della colonna attraverso più passaggi; l'eluizione dell'RNA (**figura 5**).

Nel dettaglio, il protocollo d'estrazione del kit prevede i seguenti step:

1. Diluire il sangue intero (50  $\mu$ l) con 50  $\mu$ l di PBS;
2. Trasferire il sangue intero non coagulato in eppendorf RNasi-free;
3. Aggiungere 350  $\mu$ l di *Buffer RL* e vortexare per 10 secondi, per ottenere una soluzione trasparente;
4. Aggiungere 200  $\mu$ l di etanolo 95-100% e vortexare per 10 secondi;
5. Assemblare la colonna cromatografica ad un *Collection Tube*, presente nel kit;
6. Trasferire un volume massimo di lisato di 600  $\mu$ l alla colonna e centrifugare a 6500 RPM per un minuto. Scartare successivamente l'eluato;
7. Verificare il passaggio attraverso il filtro dell'intero volume presente nella colonna e in caso contrario centrifugare ulteriormente a 14000 RPM per un minuto;
8. Ripetere i due precedenti passaggi fino all'esaurimento del campione, in modo che tutto il sangue passi attraverso il filtro della colonna;
9. Aggiungere 400  $\mu$ l di *Wash Solution* e centrifugare per un minuto a 11000 RPM;
10. Ripetere i lavaggi con *Wash Solution* per altre due volte, scartando di volta in volta l'eluato del *Collection Tube*;
11. Centrifugare per 2 minuti a 13000 RPM per asciugare la resina;

12. Scartare il *Collection tube* e trasferire la colonna ad un *Elution tube*, fornito dal kit;
13. Aggiungere 20  $\mu$ l di *Elution Solution* alla colonna e centrifugare per 2 minuti a 2000 RPM e successivamente per un minuto a 13000 RPM;
14. Trasferire nuovamente l'RNA eluito nella colonna corrispondente e ripetere i passaggi di centrifugazione, in modo da aumentare il recupero di RNA dalla resina. Mantenere i campioni di RNA purificato in ghiaccio fino al momento dell'utilizzo o della conservazione a  $-80^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 5.** Passaggi di estrazione e purificazione dell'RNA totale.

Successivamente si procede con la quantizzazione dell'RNA estratto per mezzo del *Nanodrop ONE* (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA), in  $\text{ng}/\mu\text{l}$ . Tale strumento utilizza la capacità degli acidi nucleici di assorbire la luce UV per poter ottenere una misura accurata della quantità di RNA presente in  $1 \mu\text{l}$  di campione in pochi secondi.

### **3.3 Retrotrascrizione degli mRNA**

La retrotrascrizione (Reverse Transcription RT) permette di ottenere molecole di DNA a singolo filamento (cDNA) complementari a molecole di RNA di partenza. Sono necessari diversi reagenti forniti dal kit PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (Takara Bio Europe) e conservati in congelatore alla temperatura di  $-20^{\circ}\text{C}$ . Essi sono:

Deossiribonucleosidi trifosfato (dNTPs), buffer contenente ioni  $Mg^{+}$ , enzima Trascrittasi Inversa (RT) e random Primers (Forward e Reverse) in grado di legare punti diversi delle sequenze. Per la reazione è necessaria anche l'Acqua ( $H_2O$ ), che viene prima autoclavata e filtrata per evitare contaminazioni. L'enzima Trascrittasi Inversa è una DNA-polimerasi RNA-dipendente in grado di sintetizzare una sequenza di DNA complementare ad un filamento di RNA guida a partire da un innesco per la polimerizzazione, ovvero i random primers.

Il protocollo specifico per la reazione di retrotrascrizione prevede due fasi:

- L'eliminazione del DNA genomico presente nel campione tramite l'utilizzo di DNasi, enzimi in grado di degradare specificatamente il DNA;
- La reazione di retrotrascrizione vera e propria operata dalla trascrittasi inversa.

Per il primo step, viene preparata in ghiaccio un'unica mix di reazione, secondo i volumi indicati dalla **tabella 2**, con aggiunta di un piccolo eccesso.

**Tabella 2.** Volumi dei reagenti necessari per la mix per l'eliminazione del DNA per un campione.

<b>5X gDNA Eraser Buffer</b>	2.0 $\mu$ l
<b>gDNA Eraser</b>	1.0 $\mu$ l

Successivamente vengono allestite eppendorf da 0.2 ml per ogni campione, contenenti: un volume di RNA corrispondente alla quantità che si intende retrotrascrivere; la quantità di  $H_2O$  mancante per raggiungere un volume complessivo di 7  $\mu$ l; un volume di 3.0  $\mu$ l di mix

vortexata e centrifugata. La soluzione di 10  $\mu$ l totali, per ogni campione, viene poi posta a 42°C per 2 minuti.

Per il secondo step, viene preparata in ghiaccio un'unica mix di reazione, secondo i volumi indicati dalla **tabella 3**, con aggiunta di un piccolo eccesso.

**Tabella 3.** Volumi dei reagenti necessari per la mix per la retrotrascrizione per un campione.

<b>5x Primer script buffer 2</b>	4.0 $\mu$ l
<b>PrimerScript RT Enzyme mix</b>	1.0 $\mu$ l
<b>RT primer mix</b>	1.0 $\mu$ l
<b>H<sub>2</sub>O</b>	4.0 $\mu$ l
<b>Volume totale</b>	10.0 $\mu$ l

Successivamente la mix viene vortexata e centrifugata, per poi essere dispensata in ogni campione allestito nel passaggio precedente, con un volume pari a 10  $\mu$ l. Infine i campioni subiscono tre passaggi a temperature diverse per mezzo del termociclatore PTC-200 Peltier Thermal Cycler, ovvero:

1. 16 °C per 30 minuti;
2. 42 °C per 30 minuti;
3. 85 °C per 5 minuti.

Terminati i cicli, lo strumento mantiene i campioni a 4°C indefinitamente per evitarne il danneggiamento, prima di essere trasferiti in ghiaccio per procedere con la successiva Real-Time PCR.

### 3.4 Real Time-PCR

La Real Time-PCR (qPCR) è una PCR che permette di effettuare una contemporanea amplificazione e valutazione quantitativa del cDNA presente nel campione, attraverso l'utilizzo di un colorante fluorescente in grado di intercalarsi in sequenze di DNA a doppio filamento. In questo caso, la reazione viene condotta utilizzando la TB Green Premix Ex Taq (Takara). L'intensità di fluorescenza rilevata viene convertita, attraverso un software, in un valore numerico, che risulta direttamente proporzionale alla quantità di RNA presente nel campione di partenza.

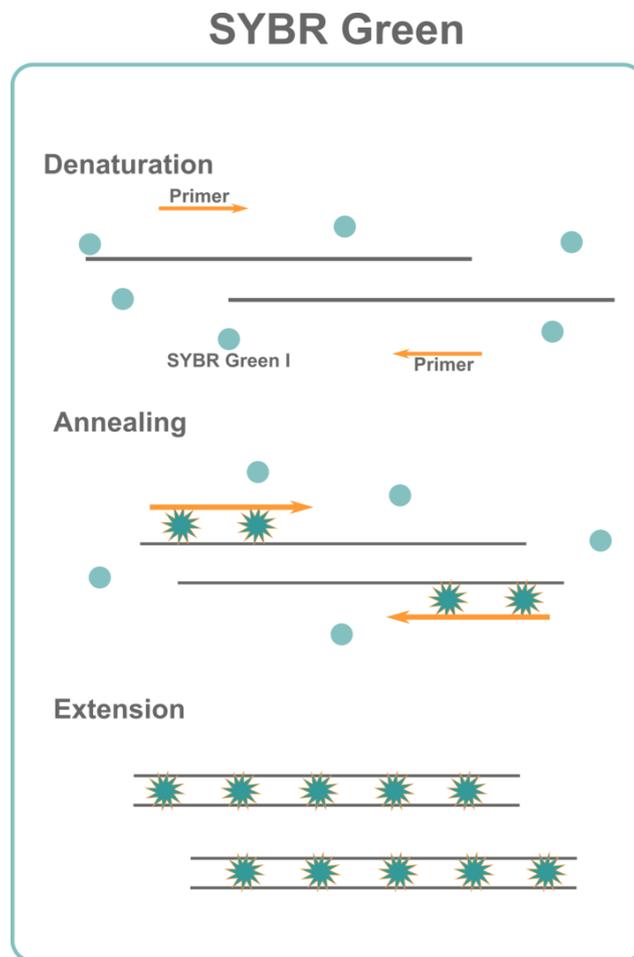
Analogamente alla retrotrascrizione, è necessario allestire mix specifiche per i primer da utilizzare secondo i volumi riportati in **tabella 4**, considerando il numero dei campioni in doppio più un eccesso.

**Tabella 4.** Volumi dei reagenti interessati nella Real-Time per un campione.

<b>TB Green</b>	5.0 µl
<b>Primer Forward</b>	0.2 µl
<b>Primer Reverse</b>	0.2 µl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	3.1 µl

Successivamente, si procede con la dispensazione di 8.5 µl di mix, vortexate e centrifugate, in provette da 0.1 ml; si aggiunge poi un volume pari a 1.5 µl di campione di cDNA, per ottenere un volume finale per la reazione pari a 10 µl. I campioni allestiti vengono quindi analizzati con lo strumento Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Germania), che esegue le fasi di denaturazione, annealing ed elongazione secondo il protocollo di amplificazione (**figura 6**):

1. 95°C per 10 minuti;
2. 95°C per 15 secondi;
3. 60°C per 1 minuto.



**Figura 6.** Meccanismo d'azione della SYBR green.

Gli ultimi due passaggi vengono ripetuti per 40 cicli. Ad ogni ciclo si ottiene un aumento esponenziale della fluorescenza della SYBR green proporzionale alla quantità di prodotto presente nel campione. L'intera corsa ha una durata di circa 80/90 minuti, al termine dei quali è possibile valutare i dati registrati durante l'amplificazione.

### *3.4.1 Analisi dei dati*

La lettura del segnale da parte dello strumento avviene al termine di ogni ciclo e consente di rappresentare l'andamento di fluorescenza in tempo reale nei singoli campioni con curve di amplificazione. Per effettuare l'analisi dei dati, è importante impostare la linea soglia (*Threshold line*), che permette di ricavare il valore del ciclo soglia (*Ct* o *threshold cycle*), il ciclo corrispondente all'intersezione tra la curva in analisi e la linea soglia. Tale valore indica il ciclo a cui si rileva una fluorescenza che supera il segnale di fondo ed è inversamente proporzionale alla concentrazione iniziale di RNA. È possibile, quindi, risalire alla quantità di RNA presente nel campione attraverso un confronto tra i valori di *Ct* degli mRNA d'interesse con i *Ct* degli mRNA normalizzatori, ovvero codificati da geni di riferimento costitutivamente espressi (geni housekeeping). In questo caso, è stata utilizzata come controllo endogeno la  $\beta$ -actina.. I passaggi d'analisi sono stati:

- per ogni campione è stato sottratto il *Ct* dell'actina a quello dell'mRNA d'interesse, ottenendo il  $\Delta Ct$ ;
- per ogni campione è stata calcolata l'espressione relativa, pari a  $2^{-\Delta Ct}$ , ovvero il livello d'espressione relativa dell'mRNA normalizzato.

### ***3.5 Analisi del miRNoma tramite tecnologia Next Generation Sequencing (NGS)***

L'analisi del miRNoma mediante tecnologia NGS è stata condotta in collaborazione con il gruppo di Patologia Sperimentale della facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli studi di Bologna.

Da tutti i 12 pazienti sono stati raccolti campioni di sangue prima e dopo l'inizio della terapia con risankizumab attraverso un prelievo ematico, di cui 5 ml in EDTA per plasma. I

campioni sono stati centrifugati, entro due ore dal prelievo, a 1800 RPM per 10 minuti a temperatura ambiente per separare il plasma, che è stato aliquotato in eppendorf e congelato a -80°C. L'RNA per l'analisi è stato estratto da 300 µl di plasma mediante l'utilizzo dell'estrattore automatico Maxwell (Promega) seguendo il protocollo del "miRNA Plasma & serum kit" (#AS1680) che permette di ottenere RNA totale comprensivo dei microRNA. L'eluizione è stata fatta in 50 µl di H<sub>2</sub>O. Le librerie di microRNA sono state generate utilizzando il kit Qiaseq miRNA Library Kit (Qiagen) secondo le indicazioni del produttore. Brevemente, 5 µl di RNA purificato ed eluito in H<sub>2</sub>O (corrispondenti a circa 30 ng) sono usati come materiale di partenza e sono stati legati agli adattatori di sequenza P7 e P5 all'estremità 3' e 5' rispettivamente. Nello step successivo i frammenti di RNA con gli adattatori legati sono stati retrotrasritti in cDNA e contestualmente sono stati inseriti gli UMI. Gli "UMI", anche conosciuti come *Indici Molecolari Unici*, sono brevi sequenze di otto nucleotidi uniche che permettono di identificare i vari template (stampi) di origine. Il vantaggio delle librerie generate con l'inserimento degli UMI è riconducibile alla possibilità di contare un numero reale di reads evitando gli artefatti di amplificazione provenienti dallo stesso template ( frammento stampo). Il cDNA viene poi amplificato tramite un Forward primer universale e un Reverse primer contenente il barcode (indice) specifico per identificare il paziente. I barcode sono sequenze di 6 o 8 nucleotidi (a seconda del tipo di formato del kit che si utilizza) indispensabili per riconoscere quali appartengono ad ogni campione, tra tutte le sequenze generate dal sequenziamento. Successivamente ogni libreria è stata controllata da un punto di vista qualitativo e quantitativo mediante l'utilizzo della piattaforma Agilent Bioanalyzer, utilizzando il kit High Sensitivity DNA Kit (cat. n. 5067-4626, Agilent Technologies, USA). Il kit permette di quantificare piccole concentrazioni di libreria mediante un algoritmo, che calcola l'area sotto la curva per ogni singolo

elettroferogramma di DNA corrispondente alla libreria, fornendoci le concentrazioni in pg/ul e la concentrazione molare. Successivamente tramite questa quantificazione è stato generato un “pool equimolare”, ossia un pool contenente lo stesso numero di moli di ogni libreria, che è stato poi diluito a 2000 pmol/L in accordo con il protocollo di sequenziamento. Il pool è stato poi ricontrollato nuovamente sul Agilent BioAnalyzer.

Il pool diluito a 2000 pmol/L è stato denaturato e neutralizzato per ottenere singoli filamenti di DNA templatato, poi nuovamente diluito a 1.5 pM e caricato sulla cartuccia di sequenziamento del kit Illumina High Output Kit v2 (75 cicli) (Illumina; FC-404-2005). Il sequenziamento è stato eseguito sulla piattaforma Illumina NextSeq 500/550.

Al termine del sequenziamento sono stati generati dei file di sequenza in formato “FastQ” dal sistema Illumina NextSeq 500. Si tratta di file di testo contenenti sia le sequenze grezze (non elaborate) che gli score di qualità delle stesse. *FASTQ file* sono poi stati caricati su GeneGlobe® Data Analysis Center, un sito di prima analisi generato da Qiagen che, dopo avere eliminato gli adapter ed allineato le sequenze ad un set di database (tra cui miRBase), produce un file Excel contenente tutte le informazioni sulle reads generate per ogni paziente. Il file presenta un riassunto del sequenziamento in termini di conte reali, fornendo indicazioni per ogni campione sul numero di reads totali generali e di ogni tipologia di smallRNA sequenziata (miRNA, hairpin, piRNA, rRNA, tRNA, mRNA ed altri smallRNA non mappabili e non classificabili). Nella fase di generazione della libreria queste tipologie di smallRNA diverse dai miRNA, oggetto dello studio, occupano una parte irrisoria della flow cell e dell’output finale (si tratta di sequenze che vengono generate nella libreria ma che sono aspecifiche, non di interesse in questo tipo di esperimento e rappresentano su una media di reads totali di 3.3million /paziente circa 790000 reads).

### 3.6 Analisi dei Treg con citofluorimetro

L'analisi della sottopopolazione linfocitaria delle cellule T regolatorie (Treg) è stata eseguita mediante Citofluorimetria o citometria a flusso (CFM). La CFM è una tecnica che consente di rilevare, identificare e contare specifiche cellule, in virtù delle loro caratteristiche fluorescenti e fisiche (complessità interna, dimensione, granulosità). L'analisi consta di due fasi: una prima fase di marcatura con coloranti specifici del campione in esame, una seconda fase di analisi al citofluorimetro.

Il trattamento del campione da discriminare nei diversi sottotipi cellulari prevede l'utilizzo di anticorpi monoclonali, coniugati a fluorocromi, diretti verso particolari distretti cellulari o antigeni di superficie. Il protocollo da seguire per tale trattamento prevede le seguenti fasi:

- Centrifugare, entro due ore dal prelievo, a 1800 RPM per 10 minuti i campioni di sangue per separare il plasma;
- Preparare le mix di anticorpi nei tubi al buio, dopo averli siglati, secondo i volumi indicati in **tabella 5**. Aggiungere l'anticorpo anti-FOXP3 solamente dopo il passaggio di lisi e permeabilizzazione, essendo un colorante intracellulare;

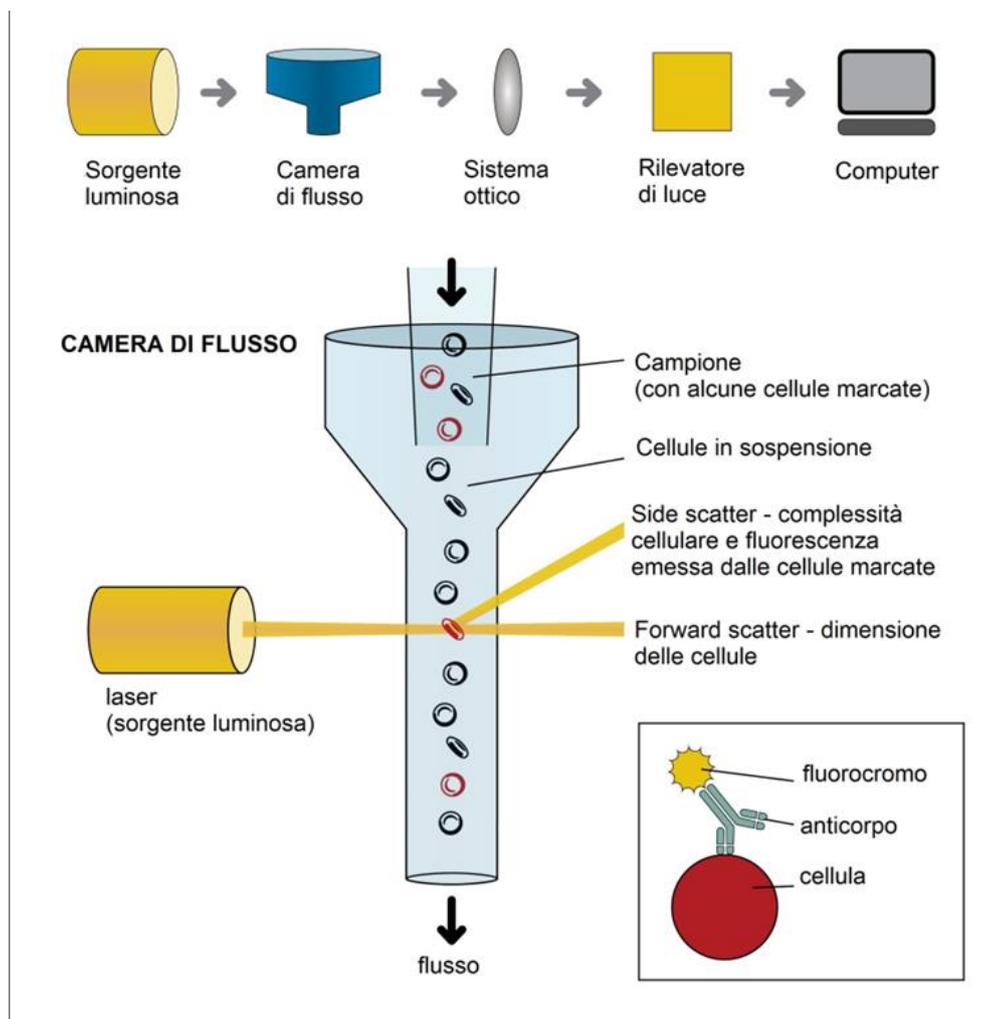
**Tabella 5.** Volumi di anticorpi necessari per la preparazione della mix.

anti-CD4 (FITC)	5 µl
anti-CD45RO (PE)	5 µl
anti-CD127 (PE-Cy7)	1.26 µl
anti-CD25 (APC)	1.26 µl
anti-CD3 (APC-Cy7)	1.26 µl
anti-FOXP3(PerCP-Cy5.5)	1-26 µl

I fluorocromi utilizzati per la marcatura sono: Fluoresceina isotiocianato (FITC), Ficoeritrina (PE), Allofococianina (APC), Ficoeritrina-Cianina 7 (PE-Cy7), Allofococianina-Cianina 7 (APC-Cy7), Peridinin-chlorophyl-Cianina 5.5 (PerCP-Cy5.5).

- Isolare il plasma e prelevare 200  $\mu$ l di sangue, dopo aver agitato la provetta, da aggiungere alla mix di anticorpi;
- Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente al buio per effettuare la marcatura di superficie;
- Preparare 4 ml per campione di soluzione di lisi *Lysing solution* 1:10 in H<sub>2</sub>O distillata e aggiungere al campione al termine dell'incubazione;
- Vortexare la soluzione e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente al buio;
- Centrifugare a 1800 RPM per 10 minuti al buio e successivamente scartare il surnatante;
- Preparare 1 ml per campione di soluzione di permeabilizzazione *Permeabilization buffer* 1:10 in H<sub>2</sub>O distillata e aggiungere al campione al termine della centrifugazione;
- Vortexare la soluzione e incubare per 10 minuti a temperatura ambiente al buio;
- Aggiungere 4 ml di PBS e centrifugare a 1800 RPM per 10 minuti al buio;
- Scartare il surnatante e aggiungere anti-FOXP3 secondo i volumi della tabella 5. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente al buio;
- Aggiungere 4 ml di PBS e centrifugare a 1800 RRM per 10 minuti al buio;
- Scartare il surnatante e diluire il campione ottenuto con 200-400  $\mu$ l di PBS per l'acquisizione al citofluorimetro.

Il campione ottenuto, contenente le cellule marcate, viene successivamente analizzato al citofluorimetro. Tale strumento si compone di più parti: un sistema fluidico, un sistema di eccitazione, un sistema di componenti elettroniche per acquisire il segnale ed un software per analizzare i dati (77). Le cellule presenti nel campione attraversano un raggio laser allineate una dietro l'altra. Per ogni cellula che attraversa il raggio laser il citofluorimetro registra il modo in cui la cellula disperde la luce laser incidente ed emette fluorescenza, generando uno scatter caratteristico (**figura 7**). I dati ottenuti sono mostrati sotto forma di grafici, dai quali è possibile determinare la quantità percentuale di sottopopolazioni specifiche che costituiscono il campione.



**Figura 7.** Schema di citometria a flusso.

### ***3.7 Analisi statistica***

Il software statistico utilizzato è stato SPSS/Win (versione 25.0, SPSS, Chicago). Le variabili continue con distribuzione normale sono state riportate come media  $\pm$  deviazione standard (SD). Le variabili dicotomiche sono state riportate come numero, percentuale (%). I confronti tra le variabili continue sono stati eseguiti utilizzando il t-test, il Paired t-test o il Mann-Whitney test, come appropriato; quelli tra le variabili dicotomiche sono stati eseguiti mediante il Chi square test, il McNemar test o lo Z-test, come appropriato. Il test di correlazione Spearman's rho è stato utilizzato per stimare le correlazioni tra livelli di espressione dei miRNA e i parametri clinici. Un valore  $p < 0.05$  è stato considerato statisticamente significativo.

I dati di NGS sono stati analizzati usando il pacchetto DESeq2 per R, versione 4.2.2. L'espressione differenziale è stata valutata comparando T1 e T0 e controllando i confronti per l'identificativo di ciascun paziente. I miRNA che hanno mostrato una differenza di espressione tra T1 e T0 sono stati identificati usando come filtro un fold change  $\geq 1.5$  e FDR 10% dopo correzione secondo Benjamini-Hochberg.

## Capitolo quarto

### RISULTATI

#### *4.1 Caratteristiche dei pazienti*

Sono stati reclutati 12 soggetti (n=12) che si sono recati presso la Clinica Dermatologica dell'Università Politecnica Delle Marche - "Ospedali Riuniti" di Ancona, tra gennaio 2021 e luglio 2022.

Tutti i pazienti selezionati hanno soddisfatto i criteri d'inclusione dello studio in quanto maggiorenni, con psoriasi a placche moderata-severa, non sottoposti a trattamenti un mese prima dell'arruolamento e idonei alla terapia anti-IL-23 con risankizumab. Dei 12 individui, 9 uomini e 3 donne, nessuno era affetto da altre varianti di psoriasi (eritrodermica, suberitrodermica, psoriasi pustolosa ecc.) e artrite psoriasica. Al momento della visita dermatologica al basale (T0) è stato riscontrato quanto segue: la durata media della malattia era di 15.6 anni (range 1-46, deviazione standard [DS]  $\pm 14$ ); l'età media alla diagnosi della patologia era di 29.3 anni; il 25% dei pazienti ha riferito una storia familiare positiva alla psoriasi; 10 pazienti su 12 mostravano interessamento di sedi speciali (83.3%), di cui 3 con interessamento di due o più sedi speciali, 2 pazienti su 12 (16.7%) presentavano lesioni al volto, 3/12 (25%) palmo-plantari, 7/12 (58.3%) al cuoio capelluto e 2/12 (25%) alla zona genitale.

Per quanto riguarda terapie precedenti, tutti i pazienti avevano eseguito, senza successo, trattamenti con farmaci antireumatici modificanti la malattia (DMARD): 4/12 pazienti (33.3%) con acitretina, 7/12 con ciclosporina (58.3%), 3/12 (25%) con metotrexato. e 1/12 (8.3%) con apremilast. Dei 12 pazienti in studio, 10 (83.3%) erano naïve alla terapia biologica, mentre per i 2 restanti (16.7%) la terapia con almeno un farmaco biologico non

ha avuto successo. Di questi ultimi, 1 (8.3%) ha fallito la terapia con adalimumab e apremilast e 1 (8.3) con adalimumab, certolizumab ed etanercept.

#### 4.1.1. Confronto di PASI, BSA, PGA, DLQI pre e post-trattamento

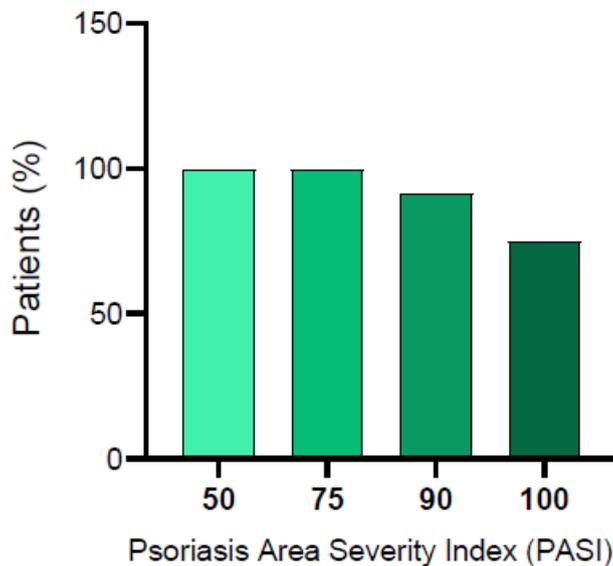
Nei pazienti osservati in T0 (pre- risankizumab), il punteggio PASI medio era 19.9 (3-33.2, DS:  $\pm$  14.8). 7 pazienti su 12 (58.3%) avevano un punteggio PASI compreso tra 10 e 20, corrispondente a psoriasi moderata, mentre 4/12 (33%) avevano un punteggio PASI superiore a 20, corrispondente a psoriasi severa. Il BSA medio era del 27.8% (3-75, DS:  $\pm$  0.2), il PGA medio era di 3.3 (3-4, DS:  $\pm$  0.5), il DLQI medio era di 7.1 (2-15, DS:  $\pm$  3.6).

Dopo un anno di trattamento con risankizumab (T1), tutti hanno raggiunto PASI 50, ovvero un miglioramento del PASI del 50% a seguito del trattamento, e il PASI 75 (miglioramento del 75%); 11/12 (91.7%) hanno raggiunto il PASI 90 (miglioramento del 90%) e 9/12 (75%) il PASI 100, raggiungendo una completa remissione dei sintomi (78). Il punteggio PASI medio in T1 era 0.4 (0-2, DS:  $\pm$  0.8;  $p < 0.0007$ ), il BSA medio era 0.4% (0-2, DS:  $\pm$  0.01;  $p < 0.0018$ ), il PGA medio era 0.25 (0-1, DS:  $\pm$  0.5;  $p < 0.0001$ ), il DLQI medio era 0.25 (0-1, DS:  $\pm$  0.5;  $p < 0.00008$ ). I risultati sono riportati nella **tabella 6** e nella **figura 8**. Nessun paziente ha riportato eventi avversi durante il follow-up.

**Tabella 6.** PASI, PGA, BSA, DLQI nei pazienti pre-risankizumab (T0) e dopo un anno di trattamento (T1).

	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>p</b>
<b>PASI m (DS)</b>	19.9 $\pm$ 14.8 (3-33.2)	0.4 $\pm$ 0.8 (0-2)	0.0007
<b>BSA m (%) (DS)</b>	27.8 $\pm$ 0.2 (3-75)	0.4 $\pm$ 0.01 (0-2)	0.0018
<b>PGA m (DS)</b>	3.3 $\pm$ 0.5 (3-4)	0.25 $\pm$ 0.5 (0-1)	0.0001

<b>DLQI m (DS)</b>	7.1 ± 3.6 (2– 15)	0.25 ± 0.5 (0-1)	0.00008
--------------------	-------------------	------------------	---------

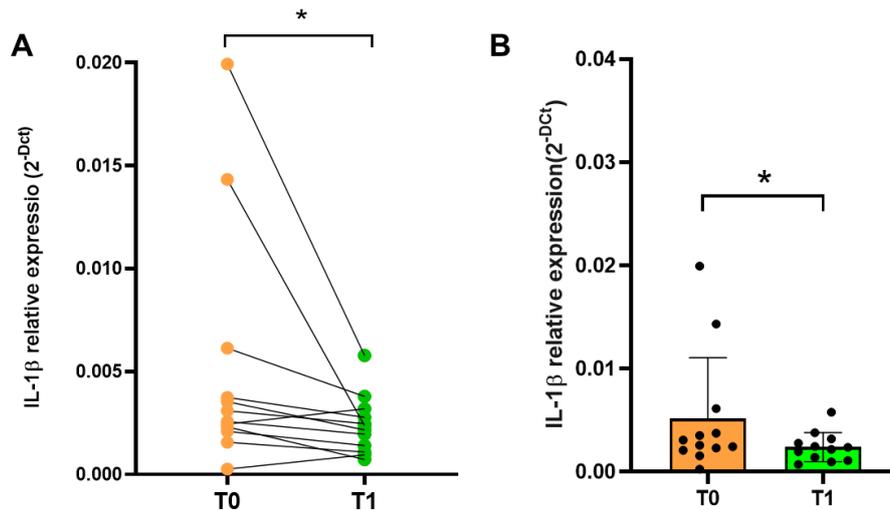


**Figura 8.** Percentuale di pazienti con psoriasi che hanno raggiunto PASI50, PASI 75, PASI, 90, PASI 100 dopo un anno di trattamento con risankizumab (T1).

#### *4.2 Analisi dell'espressione genica della citochina pro-infiammatoria IL-1 $\beta$ e della popolazione di linfociti Treg nel sangue intero dei pazienti psoriasici prima e dopo trattamento con risankizumab*

La psoriasi non è una malattia esclusivamente cutanea ma si assiste alla persistenza di livelli elevati di mediatori immunitari, che instaurano così un'inflammatione sistemica cronica. Inoltre, tale patologia è caratterizzata dalla compromissione della funzione regolatoria dei Treg che porta ad un'alterazione dell'equilibrio tra i linfociti T-helper 17 e i Treg (1).

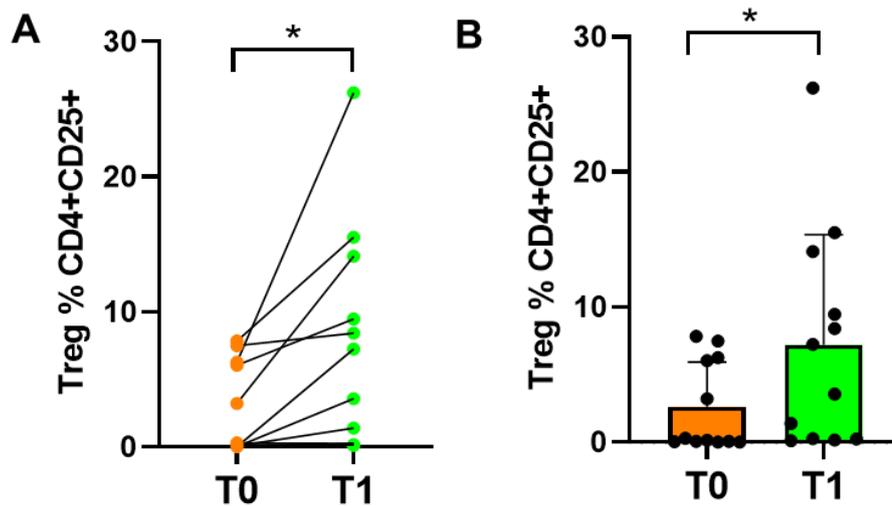
Abbiamo quindi misurato i livelli di espressione genica di una tra le principali citochine pro-infiammatorie, l'interleuchina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). Abbiamo osservato che in seguito al trattamento con terapia anti-IL-23, i livelli di espressione dell'IL-1 $\beta$  risultano significativamente ridotti ( $p=0.028$ ) (**figura 9 A e B**).



**Figura 9.** Livelli di espressione di IL-1 $\beta$  in T0 e in T1 (A e B).

In seguito, abbiamo valutato mediante analisi citofluorimetrica, la percentuale della popolazione di Treg (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup>), selezionata a partire dalla popolazione di linfociti CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>.

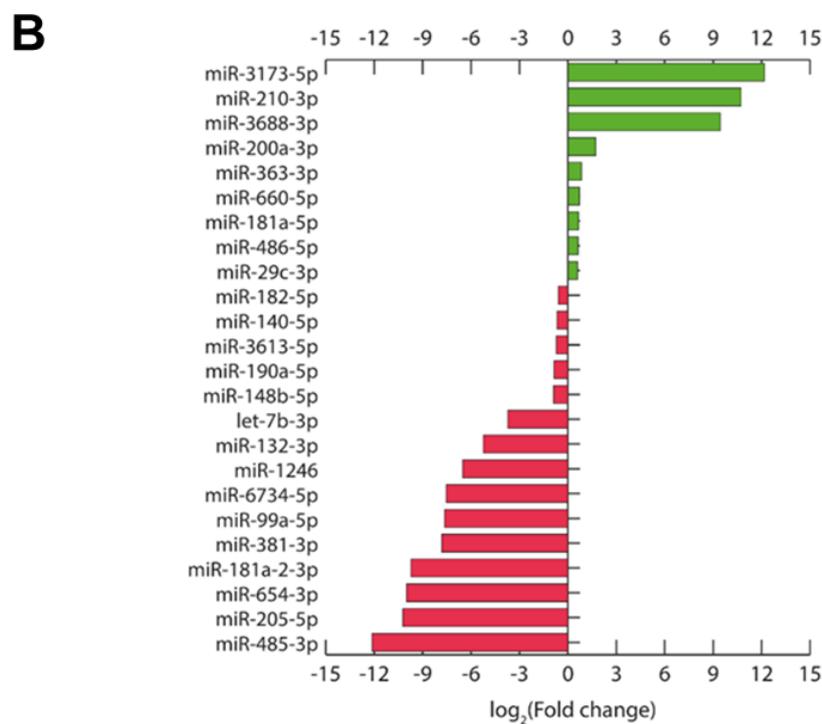
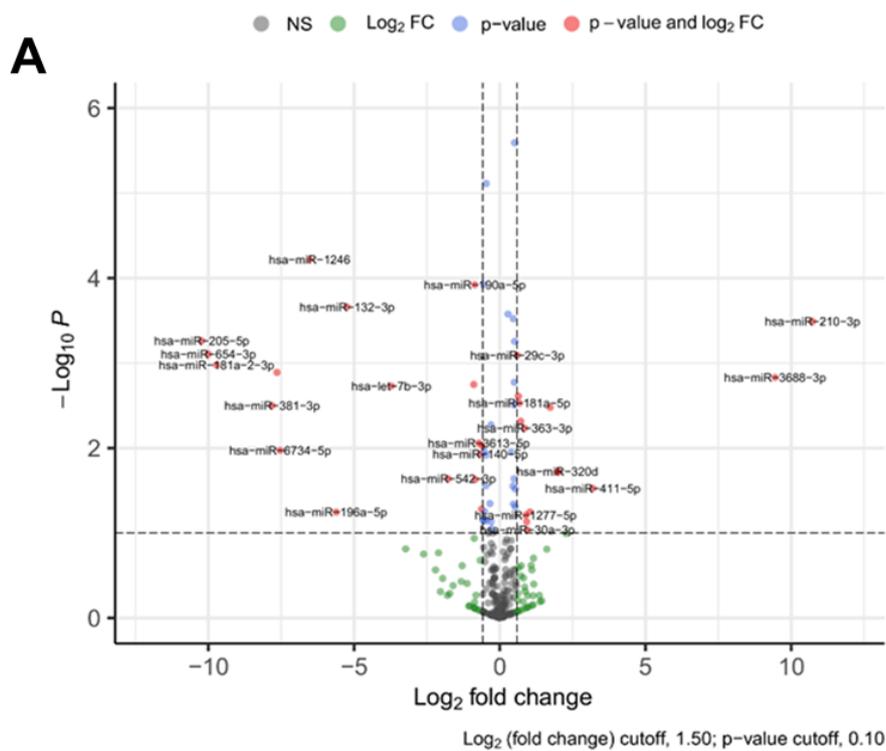
La popolazione di Treg, che dati di letteratura indicano come ridotta nel paziente psoriasico, aumenta in maniera significativa ( $p=0.025$ ) dopo un anno di trattamento con risankizumab (**figura 10 A e B**).



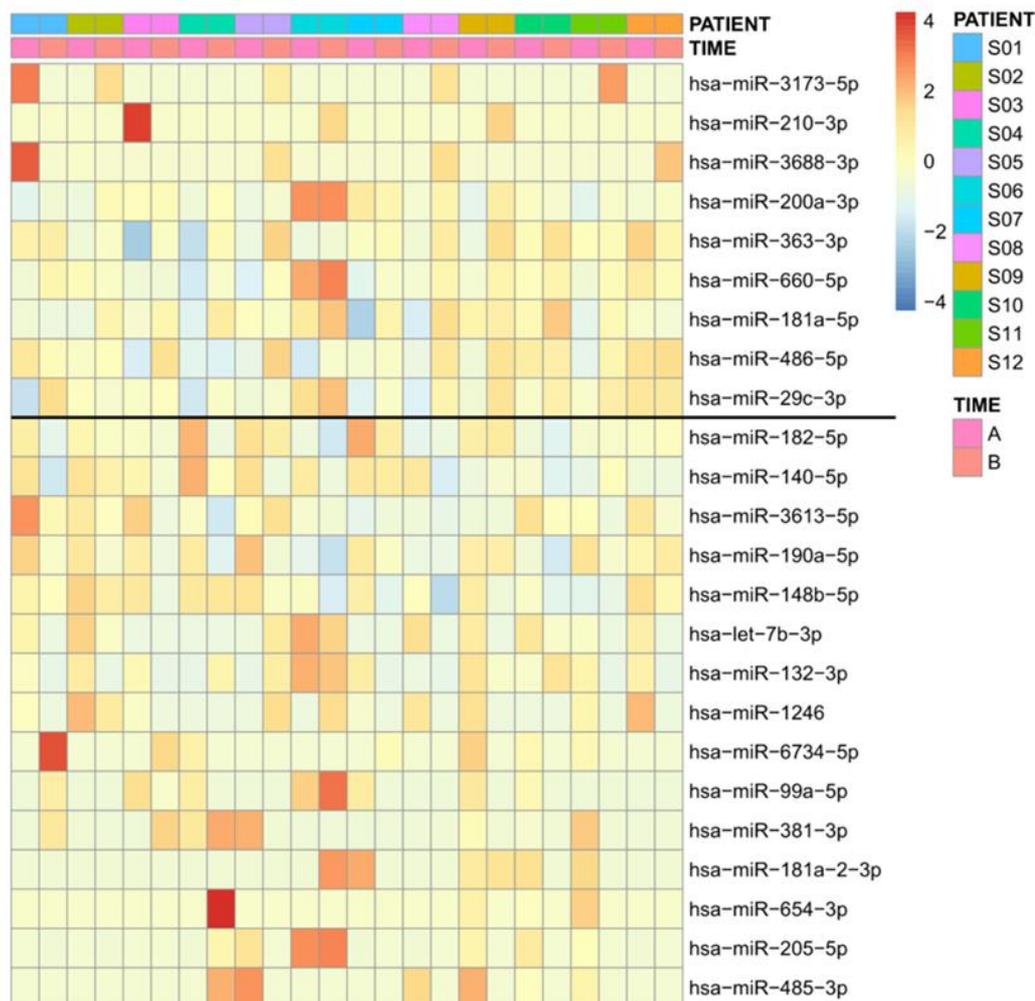
**Figura 10.** Popolazione di Treg in T0 e in T1 (A e B).

#### **4.3 Analisi del miRNoma da plasma di pazienti psoriasici in trattamento con risankizumab**

L'espressione del miRNoma totale è stata analizzata nel plasma di 12 pazienti prima (T0) e dopo trattamento con risankizumab per 12 mesi (T1). I miRNA che mostrano una differenza significativa tra il T0 e il T1 sono riportati nelle figure 11 e 12. La **figura 11** (pannello A) mostra il volcano plot dei miRNA up- e down-regolati dopo trattamento con risankizumab. Sono stati selezionati solo i miRNA con un fold change T1/T0 (espresso come  $\text{Log}_2$ ) di almeno 1,5 e un p-value  $\leq 0.10$ . In **figura 11** (pannello B) il diagramma a barre mostra i 9 miRNA upregolati (in verde) e i 15 miRNA downregolati (in rosso). La heatmap (**figura 12**) rivela l'espressione di ogni miRNA nei singoli pazienti in T0 e in T1.



**Figura 11.** (A) Volcano plot dei miRNA up- e down-regolati dopo trattamento con risankizumab. (B) Diagramma a barre dei 9 miRNA upregolati (in verde) e dei 15 miRNA downregolati (in rosso).



**Figura 12.** Heatmap dell'espressione di ogni miRNA nei singoli pazienti in T0 e in T1.

#### 4.3.1 Identificazione ed analisi dei target predetti per il cluster di miRNA upregolati e downregolati

Una volta che sono stati identificati i 9 miRNA significativamente upregolati e i 15 miRNA significativamente downregolati, sono stati analizzati mediante il programma DIANA-miRpath v.3 (79).

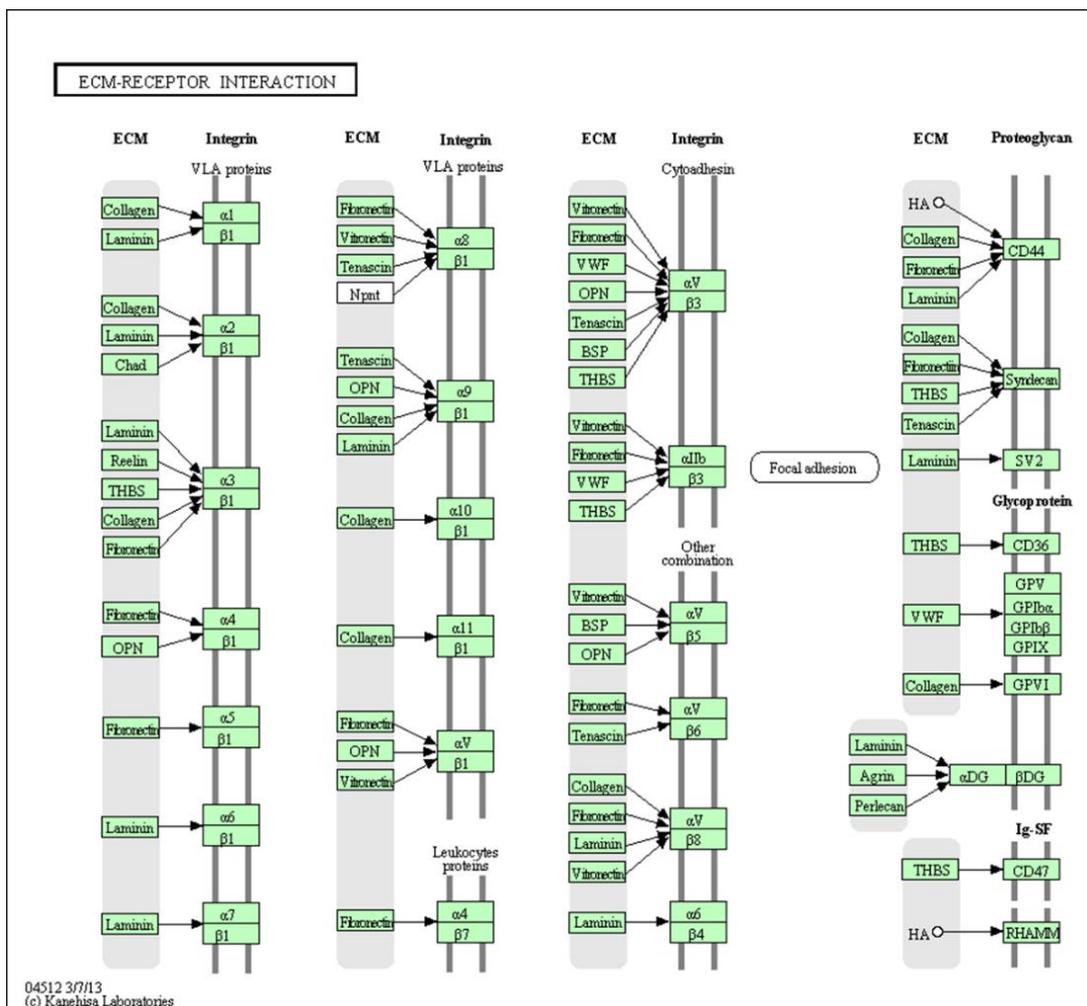
Questo strumento permette di identificare gli RNA messaggeri target dei miRNA selezionati ed i pathway in cui sono coinvolti mediante l’algoritmo di predizione dei target DIANA-microT-CDS.

La **tabella 7** riporta i 14 pathway significativamente regolati dai 9 miR up-regolati, elencati in ordine di significatività. È interessante notare che il primo pathway individuato è relativo alla matrice extracellulare e all’interazione con i recettori di membrana (i.e. integrine). Queste interazioni controllano varie attività cellulari come l’adesione, la migrazione, la proliferazione (**figura 13**).

Inoltre, tra gli altri pathway, di rilevanza sono anche il pathway delle adesioni focali e del signalling PI3K-Akt.

**Tabella 7.** KEGG pathways dei miRNA up-regolati.

<b>KEGG pathway</b>	<b><i>p-value</i></b>	<b>genes</b>	<b>miRNAs</b>
<b>ECM-receptor interaction</b>	1.52E-55	26	7
Amoebiasis	6.49E-07	28	7
Focal adhesion	4.84E-05	54	8
Protein digestion and absorption	0.000177	29	5
Thyroid hormone signaling pathway	0.000516	25	8
PI3K-Akt signaling pathway	0.000622	72	8
Steroid hormone biosynthesis	0.001352	10	3
Amphetamine addiction	0.001352	15	7
Glioma	0.001352	17	7
Small cell lung cancer	0.002607	25	6
Renal cell carcinoma	0.002607	20	7
Proteoglycans in cancer	0.004966	38	8
mTOR signaling pathway	0.00579	19	6
Cocaine addiction	0.009535	11	6



**Figura 13.** Interazioni tra la matrice extracellulare e le integrine.

Allo stesso modo è stata effettuata l'analisi per i miR down-regolati. La **tabella 8** riporta i 136 pathway significativamente regolati dai 15 miR down-regolati, elencati in ordine di significatività.

Come possiamo osservare, i primi tre pathways potenzialmente regolati sono quelli delle giunzioni aderenti, della biosintesi delle mucine e del signalling del TGF- $\beta$ .

**Tabella 8.** KEGG pathway dei miRNA down-regolati.

<b>KEGG pathway</b>	<b>p-value</b>	<b>genes</b>	<b>miRNAs</b>
<b>Adherens junction</b>	2.65E-12	45	13
<b>Mucin type O-Glycan biosynthesis</b>	2.85E-11	14	11
<b>TGF-<math>\beta</math> signaling pathway</b>	1.20E-08	42	15
Proteoglycans in cancer	1.56E-08	79	15
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	3.32E-08	64	15
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	2.06E-07	8	5
Pathways in cancer	8.54E-07	151	15
GABAergic synapse	2.87E-06	33	14
Renal cell carcinoma	1.07E-05	35	15
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	1.08E-05	30	14
Hippo signaling pathway	2.34E-05	62	15
Bacterial invasion of epithelial cells	7.19E-05	37	14
Phosphatidylinositol signaling system	7.21E-05	35	13
Thyroid hormone signaling pathway	7.21E-05	55	14
Axon guidance	7.65E-05	53	13
Rap1 signaling pathway	8.87E-05	83	15
Prostate cancer	0.000119	43	15
Glioma	0.000129	30	13
Wnt signaling pathway	0.000662	59	15
Vasopressin-regulated water reabsorption	0.001185	22	11
Colorectal cancer	0.001597	31	11
Estrogen signaling pathway	0.001685	39	13
ErbB signaling pathway	0.003464	42	13
Glutamatergic synapse	0.004274	42	13
cGMP-PKG signaling pathway	0.005323	66	14

Cell adhesion molecules (CAMs)	0.005323	75	15
Endocytosis	0.005323	75	15
AMPK signaling pathway	0.005323	51	15
Choline metabolism in cancer	0.005323	44	15
Endometrial cancer	0.005511	24	11
Adrenergic signaling in cardiomyocytes	0.005511	52	14
Tight junction	0.005511	53	14
Focal adhesion	0.00555	78	15
Nicotine addiction	0.007569	18	9
Ras signaling pathway	0.007582	81	15
Pancreatic cancer	0.008279	29	13

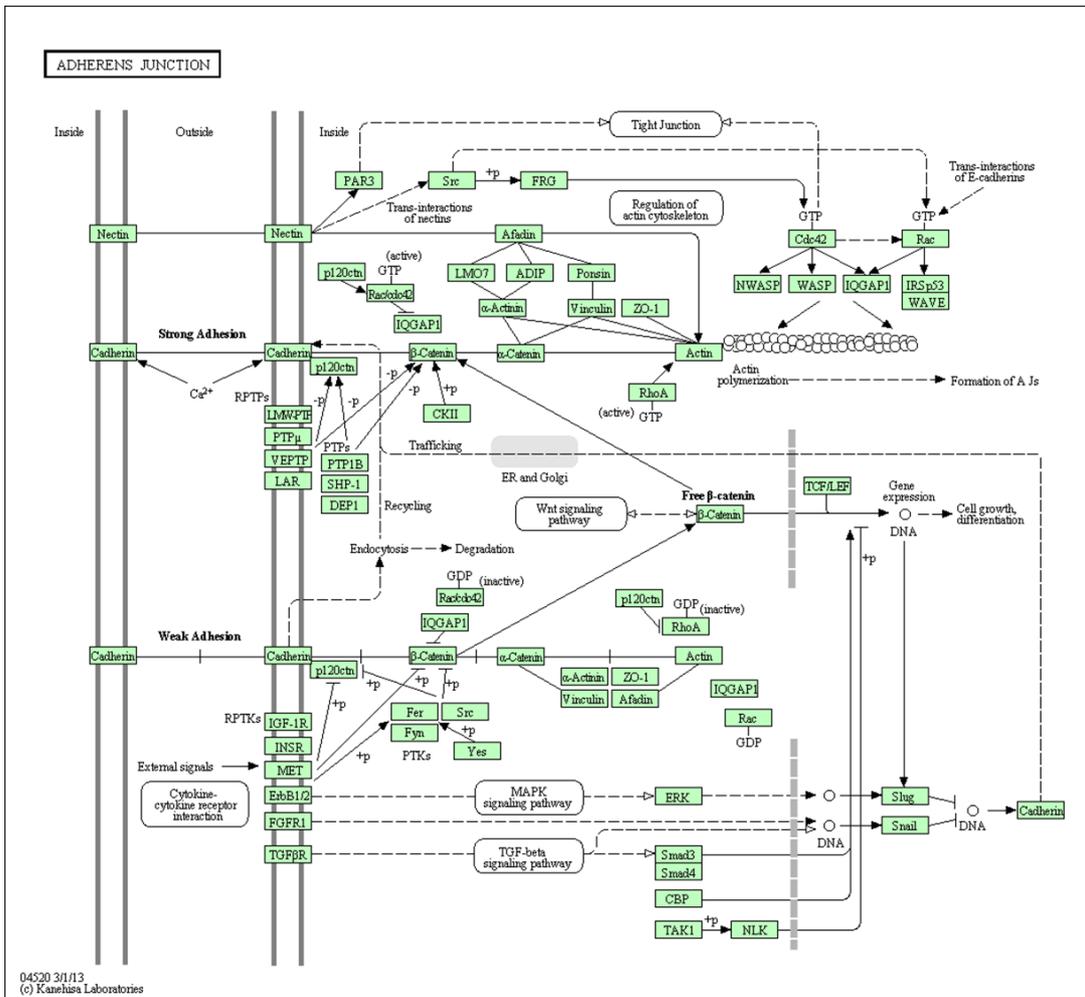
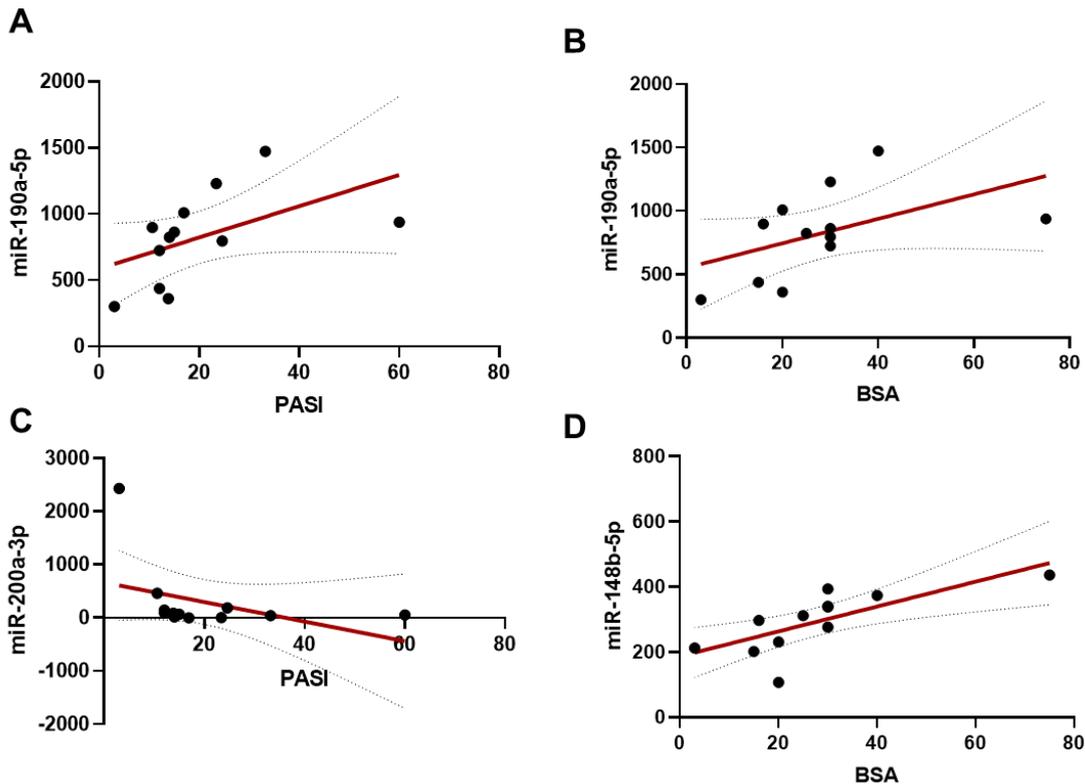


Figura 14. Pathways correlati alle giunzioni aderenti.

#### 4.4 Studio delle correlazioni tra i parametri acquisiti nei pazienti prima del trattamento con risankizumab

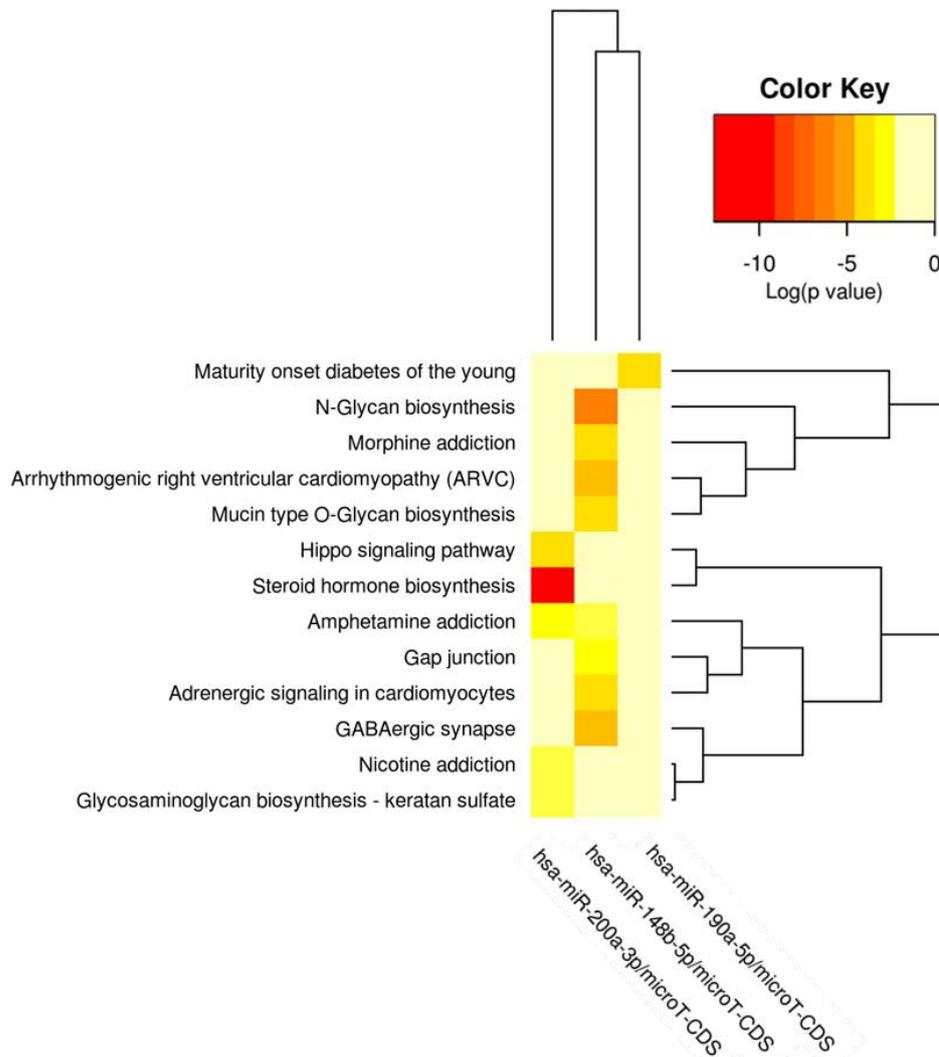
I 24 miRNA trovati significativamente deregolati dalle analisi del miRNoma sono stati correlati con i parametri che descrivono la gravità della malattia nei 12 pazienti psoriasici prima del trattamento con risankizumab.

Tra i miR down-regolati, abbiamo osservato che il miR-190a-5p correla positivamente con il PASI ( $r=0.690$ ;  $p=0.013$ ) (figura 15 A) e il BSA ( $r=0.595$ ;  $p=0.041$ ) (figura 15 B), mentre il miR-148b-5p correla con il BSA ( $r=0.834$ ;  $p=0.001$ ) (figura 15 D). Inoltre, tra i miRNA up-regolati, il miR-200a-3p correla negativamente con il PASI ( $r=0.620$ ;  $p=0.032$ ) (figura 15 C).



**Figura 15.** (A, B) miR-190a-5p down-regolato in correlazione positiva con il PASI ( $r=0.690$ ;  $p=0.013$ ) e con il BSA ( $r=0.595$ ;  $p=0.041$ ); (C) miR-200a-3p up-regolato in correlazione negativa con il PASI ( $r=0.620$ ;  $p=0.032$ ); (D) miR-148b-5p down-regolato in correlazione positiva con il BSA ( $r=0.834$ ;  $p=0.001$ ).

Infine, abbiamo analizzato i pathway potenzialmente deregolati da questi tre miRs (miR-190a-5p, miR-200a-3p e miR-148b-5p) mediante DIANA-miRpath-v.3. La heatmap in **figura 16** riporta i pathway in cui sono presenti geni target di almeno uno dei tre miRNA analizzati.



**Figura 16.** Heatmap dei pathway potenzialmente deregolati dai miR-190a-5p, miR-200a-3p e miR-148b-5p.

## Capitolo quinto

### DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La psoriasi è una malattia complessa e multifattoriale causata da un'inflammatione immuno-mediata e caratterizzata da lesioni cutanee eritemato-desquamative che possono presentarsi in alcune aree limitate o estendersi su tutto il corpo. Si tratta di una patologia che interessa principalmente la pelle ma può coinvolgere altri organi e apparati, come le articolazioni, tanto che oggi, in particolare nelle sue forme gravi, viene riconosciuta come una malattia sistemica. Per quanto riguarda i trattamenti negli ultimi anni si è assistito a una vera e propria “rivoluzione”, passando dall'uso di immunosoppressori ad ampio spettro (ciclosporina, il metotrexato, o altri farmaci di questa categoria), ai farmaci biotecnologici. I primi farmaci di questa categoria sono stati gli anti-TNF alpha. Negli anni successivi, grazie alle scoperte sui meccanismi coinvolti nella formazione e nel mantenimento della placca psoriasica, sono stati sviluppati farmaci anti-interleuchina 17 (IL-17) e anti-interleuchina 23 (IL-23). Per quanto riguarda l'IL-23, è oggi considerata l'attore principale nei meccanismi patogenetici di insorgenza dell'inflammatione sia cutanea e/o articolare che sistemica, stimolando il rilascio delle citochine IL-17, IL-22 e TNF-alpha. L'IL-23 sembra anche essere responsabile delle ricadute di malattia nei pazienti, probabilmente perché coinvolta nel riattivare specifiche cellule T della memoria localizzate al livello della cute (TRM) (80, 81). La loro riattivazione sembrerebbe correlata al manifestarsi della malattia psoriasica dopo un periodo di quiescenza. Quindi l'utilizzo dei farmaci anti IL-23 dovrebbe associarsi non solo ad un'ottima efficacia contro le manifestazioni cliniche della patologia ma potrebbe contribuire a ridurre le ricadute. Per poter ulteriormente comprendere i meccanismi alla base dell'efficacia clinica del trattamento con anti-IL-23 dei pazienti con psoriasi, abbiamo quindi

valutato alcuni aspetti ancora relegati alla ricerca, quali eventuali modificazioni del setting di microRNA circolanti, e la quantità di cellule T regolatorie presenti in circolo.

Tutti i pazienti trattati inclusi nello studio hanno mostrato un netto miglioramento della sintomatologia clinica, con miglioramento di tutti gli indici di valutazione clinica (PASI, BSA e PGA). Riguardo alle variazioni più significative dei microRNA circolanti, abbiamo evidenziato 9 miRNA upregolati e i 15 miRNA downregolati dopo 12 mesi di trattamento. Fra i miRNA che presentavano una espressione significativamente aumentata in circolo dopo il trattamento con anti IL-23 si segnala il miR-210-3p. Questo microRNA era stato precedentemente associato alla psoriasi; valori elevati in sottopopolazioni di linfociti T erano stati evidenziati in pazienti psoriasici, in relazione all'aumento di linfociti Th1 e Th17 ed alla riduzione di linfociti Th2 (82). Il coinvolgimento di questo miRNA nella patogenesi della psoriasi era successivamente stato dimostrato nel modello animale (83). La somministrazione topica di una molecola di RNA sintetico capace di bloccare l'azione del miR-210 era infatti in grado di ridurre la dermatite psoriasica indotta nel topo (83). I nostri risultati mettono in luce un importante aumento del miR-210 circolante nei pazienti psoriasici sottoposti a trattamento con anti IL-23, aumento di oltre 10 volte rispetto al basale. Questi dati apparentemente in contraddizione con la letteratura, potrebbero indicare una modulazione dell'angiogenesi indotta dal miR-210 (84). Da segnalare che fra i target diretti del miR-210 è stato identificato il transforming growth factor beta receptor 1 (TGFBR1), recettore del TGF- $\beta$  coinvolto nei processi fibrotici (84). Ricordiamo che angiogenesi, rimodellamento della matrice extracellulare e fibrosi sono meccanismi coinvolti nella patogenesi e progressione della psoriasi.

Riguardo al miR-200a che abbiamo individuato come significativamente aumentato dopo trattamento, abbiamo osservato una correlazione negativa fra i valori in circolo di questo miR al tempo T0 e il valore dell'indicatore PASI. I pazienti con la patologia clinicamente più evidente avevano i livelli più bassi del miR-200a in circolo. L'aumento dei valori circolanti di espressione di questo miRNA dopo trattamento suggerirebbe un ruolo sistemico positivo nella patologia.

Riguardo all'analisi dei pathway modulati dai 9 miRNA iperespressi dopo trattamento, sono stati evidenziati la matrice extracellulare e l'interazione con i recettori di membrana (i.e. integrine). Queste interazioni controllano varie attività cellulari come l'adesione, la migrazione, la proliferazione e potrebbero essere coinvolte nella patogenesi/progressione della psoriasi.

Riguardo ai miRNA circolanti i cui livelli sono risultati ridotti dopo trattamento, va segnalato il miR-190a-5p, downregolato dopo trattamento, in quanto significativamente e positivamente correlato con gli indici clinici della patologia psoriasica, PASI e BSA. Da dati di letteratura questo miRNA risulta associato a fenomeni di fibrosi ed angiogenesi anche se fino ad ora non era mai stato identificato nel contesto della patologia psoriasica. Questo miRNA si configura quindi come il più interessante candidato identificato in questo lavoro di tesi per valutare la risposta al trattamento anti-IL-23.

Un altro miRNA di interesse identificato nel presente lavoro è il miR-485-3p, un miRNA in grado di modulare negativamente i pathways infiammatori, lo stress ossidativo e la degradazione della matrice extracellulare in vari contesti patologici umani, inclusa la neuroinfiammazione (85, 86). Anche il miR-205-5p, ridotto in circolo dopo trattamento è risultato associato al controllo dei processi infiammatori (87). Osservazioni simili sono state fatte anche per il microRNA-381-3p (88).

Potremmo quindi concludere che i miRNA che nel nostro studio sono risultati particolarmente iperespressi in circolo dopo trattamento dei pazienti psoriasici con anti IL-23, sono stati in parte associati alla riduzione dell'angiogenesi, specialmente nei contesti dove risulta difettiva come nei pazienti psoriasici. Il miR-210-3p sembra quindi essere un promettente biomarcatore circolante per monitorare l'angiogenesi nei pazienti psoriasici. Al contrario i miRNA che abbiamo osservato essere significativamente ridotti in circolo dopo trattamento con anti IL-23, sono risultati essere associati alla modulazione negativa delle risposte proinfiammatorie, anche in contesti proinfiammatori importanti come la sepsi. Questo risultato suggerisce che il trattamento con anti IL-23 riduce significativamente il livello infiammatorio sistemico dei pazienti psoriasici trattati. L'osservazione della riduzione dei valori circolanti di IL-1 $\beta$  dopo trattamento con anti IL-23 rafforza questa ipotesi. Si ribadisce come il miR-190a-5p, downregolato dopo trattamento, sia il piú interessante candidato identificato in questo lavoro associato agli indici clinici prima del trattamento ed all'efficacia clinica del trattamento stesso. Futuri studi su casistiche piú ampie permetteranno di validare questo interessante risultato.

Riguardo ai T regolatori analizzati nel nostro studio, si conferma l'aumento dei Treg in circolo dopo trattamento in tutti i pazienti trattati. L'IL-23 induce la conversione dei Treg in Th17, promuovendo i fenomeni infiammatori (89). L'anti IL-23 ripristina i valori di Treg circolanti funzionali alla immuno-modulazione ad alla riduzione del processo infiammatorio.

## Bibliografia

1. Campanati A, Marani A, Martina E, Diotallevi F, Radi G, Offidani A. Psoriasis as an Immune-Mediated and Inflammatory Systemic Disease: From Pathophysiology to Novel Therapeutic Approaches. *Biomedicines*. 2021; 9(11):1511. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111511>
2. Nussbaum L, Chen YL, Ogg GS. Role of regulatory T cells in psoriasis pathogenesis and treatment. *Br J Dermatol*. 2021 Jan;184(1):14-24. doi: 10.1111/bjd.19380. Epub 2020 Sep 1. PMID: 32628773.
3. Soonthornchai, W., Tangtanatakul, P., Meesilpavikkai, K. *et al.* MicroRNA-378a-3p is overexpressed in psoriasis and modulates cell cycle arrest in keratinocytes via targeting BMP2 gene. *Sci Rep* 11, 14186 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93616-8>
4. Rendon A, Schäkel K. Psoriasis Pathogenesis and Treatment. *Int J Mol Sci*. 2019 Mar 23;20(6):1475. doi: 10.3390/ijms20061475. PMID: 30909615; PMCID: PMC6471628.
5. Ben Abdallah H, Johansen C, Iversen L. Key Signaling Pathways in Psoriasis: Recent Insights from Antipsoriatic Therapeutics. *Psoriasis (Auckl)*. 2021;11:83-97 <https://doi.org/10.2147/PTT.S294173>
6. Boehncke WH. Systemic Inflammation and Cardiovascular Comorbidity in Psoriasis Patients: Causes and Consequences. *Front Immunol*. 2018 Apr 5;9:579. doi: 10.3389/fimmu.2018.00579. PMID: 29675020; PMCID: PMC5895645.
7. Gisondi P, Fargnoli MC, Amerio P, Argenziano G, Bardazzi F, Bianchi L, et al. Italian adaptation of EuroGuiDerm guideline on the systemic treatment of chronic plaque psoriasis. *Ital J Dermatol Venereol* 2022;157(Suppl. 1 to No. 1):1-78. DOI: 10.23736/S2784-8671.21.07132-2
8. Bożek A, Reich A. The reliability of three psoriasis assessment tools: Psoriasis area and severity index, body surface area and physician global assessment. *Adv Clin Exp Med*. 2017 Aug;26(5):851-856. doi: 10.17219/acem/69804. PMID: 29068583.
9. Walsh JA, Jones H, Mallbris L, Callis Duffin K, Krueger GG, Clegg DO, Szumski A. The Physician Global Assessment and Body Surface Area composite tool is a simple alternative to the Psoriasis Area and Severity Index for assessment of psoriasis: post hoc analysis from PRISTINE and PRESTA. *Psoriasis (Auckl)*. 2018;8:65-74
10. Basra M, K, A, Salek M, S, Camilleri L, Sturkey R, Finlay A, Y: Determining the Minimal Clinically Important Difference and Responsiveness of the Dermatology Life Quality Index (DLQI): Further Data. *Dermatology* 2015;230:27-33. doi: 10.1159/000365390

11. Smriti K. Raychaudhuri, Emanuel Maverakis, Siba P. Raychaudhuri, Diagnosis and classification of psoriasis, *Autoimmunity Reviews*, Volume 13, Issues 4–5, 2014, Pages 490-495, ISSN 1568-9972, <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.01.008>.
12. Jiadong Yu, Qixiang Zhao, Xiaoyan Wang, Hong Zhou, Jing Hu, Linna Gu, Yawen Hu, Fanlian Zeng, Fulei Zhao, Chengcheng Yue, Pei Zhou, Guolin Li, Ya Li, Wenling Wu, Yifan Zhou, Jiong Li, Pathogenesis, multi-omics research, and clinical treatment of psoriasis, *Journal of Autoimmunity*, Volume 133, 2022, 102916, ISSN 0896-8411, <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2022.102916>.
13. Gangadhar Hari, Anoop Kishore, Sreedhara Ranganath Pai Karkala, Treatments for psoriasis: A journey from classical to advanced therapies. How far have we reached?, *European Journal of Pharmacology*, Volume 929, 2022, 175147, ISSN 0014-2999, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.175147>
14. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis Menter, Alan et al. *Journal of the American Academy of Dermatology*, Volume 60, Issue 4, 643 - 659
15. Mason AR, Mason J, Cork M, Dooley G, Edwards G. Topical treatments for chronic plaque psoriasis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009 Apr 15;(2):CD005028. doi: 10.1002/14651858.CD005028.pub2. Update in: *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;3:CD005028. PMID: 19370616.
16. Morita, A. (2018), Current developments in phototherapy for psoriasis. *J Dermatol*, 45: 287-292. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.14213>
17. Weischer M, Blum A, Eberhard F, Röcken M, Berneburg M. No evidence for increased skin cancer risk in psoriasis patients treated with broadband or narrowband UVB phototherapy: a first retrospective study. *Acta Derm Venereol*. 2004;84(5):370-4. doi: 10.1080/00015550410026948. PMID: 15370703
18. Griffiths CEM, Armstrong AW, Gudjonsson JE, Barker JNWN. Psoriasis. *Lancet*. 2021 Apr 3;397(10281):1301-1315. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32549-6. PMID: 33812489
19. Girolomoni G, Strohal R, Puig L, et al. The role of IL-23 and the IL-23/TH 17 immune axis in the pathogenesis and treatment of psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2017;31(10):1616–26
20. Megna, M., Cinelli, E., Gallo, L. *et al.* Risankizumab in real life: preliminary results of efficacy and safety in psoriasis during a 16-week period. *Arch Dermatol Res* **314**, 619–623 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00403-021-02200-7>
21. Fitch E, Harper E, Skorcheva I, Kurtz SE, Blauvelt A. Pathophysiology of psoriasis: recent advances on IL-23 and Th17 cytokines. *Curr Rheumatol Rep*. 2007 Dec;9(6):461-7. doi: 10.1007/s11926-007-0075-1. PMID: 18177599; PMCID: PMC2893221.

22. Hirsiger S, Simmen HP, Werner CM, Wanner GA, Rittirsch D. Danger Signals Activating the Immune Response after Trauma. s.l.: Mediators Inflamm, 2012 Jun 19.;2012:315941, 10 pages, doi: 10.1155/2012/315941
23. Lixiang Sun, Wenjie Liu, Ling-juan Zhang, "The Role of Toll-Like Receptors in Skin Host Defense, Psoriasis, and Atopic Dermatitis", Journal of Immunology Research, vol. 2019, Article ID 1824624, 13 pages, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/1824624>
24. Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NFκB system. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med. 2016 May;8(3):227-41. doi: 10.1002/wsbm.1331. Epub 2016 Mar 16
25. Blocking NF-κB: an inflammatory issue. Rahman A, Fazal F. 6, 2011, Proc Am Thorac Soc, Vol. 8, p. 497-503
26. NF-κB: a key role in inflammatory diseases. Tak PP, Firestein GS. 1, 2001, The Journal of Clinical Investigation, Vol. 107, p. 7-11.
27. Lin Chen, Jie Li, Ying Yao, Shanlong Wang, Shuangjin Zheng, Xinggong Ju & Bin Zhang (2021) Circulating microRNA profile unveils mechanisms of action of citretin for psoriasis vulgaris, Bioengineered, 12:1, 1838-1850, DOI: 10.1080/21655979.2021.1925205
28. Xia P, Fang X, Zhang ZH, Huang Q, Yan KX, Kang KF, Han L, Zheng ZZ. Dysregulation of miRNA146a versus IRAK1 induces IL-17 persistence in the psoriatic skin lesions. Immunol Lett. 2012 Dec 17;148(2):151-62. doi: 10.1016/j.imlet.2012.09.004. Epub 2012 Sep 24. PMID: 23018031.
29. Friedman, 2009 Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs Robin C. Friedman, Kyle Kai-How Farh, Christopher B. Burge and David P. Bartel
30. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Lee, RC, Feinbaum, RL e Ambros, V. 3 Dicembre 1993, Cell, Vol. 75(5), p. 843-54
31. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Bartel, DP. 23 Gennaio 2004, Cell., Vol. 116(2), p. 281-97
32. A computational view of microRNAs and their targets. Brown, JR e Sanseau, P. 15 Aprile 2005, Drug Discov Today, Vol. 10(8), p. 595-601
33. Identification of 188 conserved maize microRNAs and their targets. Zhang, B, Pan, X e Anderson, TA. 26 Giugno 2006, FEBS Lett., Vol. 580(15), p. 3753-62
34. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. Hunter, MP, et al. 2008, PLoS One., Vol. 3(11), p. e3694.

35. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. Mitchell, PS, et al. 29 Luglio 2008, Proc Natl Acad Sci U S A, Vol. 105(30), p. 10513-8
36. Lan H, Lu H, Wang X, Jin H. MicroRNAs as potential biomarkers in cancer: opportunities and challenges. *Biomed Res Int.* 2015;2015:125094. doi: 10.1155/2015/125094. Epub 2015 Mar 22. PMID: 25874201; PMCID: PMC4385606
37. Small RNAs have a large impact: circulating microRNAs as biomarkers for human diseases. Weiland, M, et al. Giugno 2012, *RNA Biol.*, Vol. 9(6), p. 850-9.
38. Liu, Q., Wu, D.-H., Han, L., Deng, J.-W., Zhou, L., He, R., Lu, C.-J. and Mi, Q.-S. (2017), Roles of microRNAs in psoriasis: Immunological functions and potential biomarkers. *Exp Dermatol*, 26: 359-367. <https://doi.org/10.1111/exd.13249>
39. Timis TL, Orasan RI. Understanding psoriasis: Role of miRNAs. *Biomed Rep.* 2018 Nov;9(5):367-374. doi: 10.3892/br.2018.1146. Epub 2018 Sep 11. PMID: 30402223; PMCID: PMC6200992.
40. Feng Y, Zhang X, Graves P, Zeng Y. A comprehensive analysis of precursor microRNA cleavage by human Dicer. *RNA.* 2012 Nov;18(11):2083-92. doi: 10.1261/rna.033688.112. Epub 2012 Sep 14. PMID: 22984192; PMCID: PMC3479397
41. Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex, Schwarz, Dianne S. et al. *Cell*, Volume 115, Issue 2, 199 – 208
42. Xiuli Y and Honglin W (2021) miRNAs Flowing Up and Down: The Concerto of Psoriasis. *Front. Med.* 8:646796. doi: 10.3389/fmed.2021.646796
43. Breving K, Esquela-Kerscher A. The complexities of microRNA regulation: mirandering around the rules. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010 Aug;42(8):1316-29. doi: 10.1016/j.biocel.2009.09.016. Epub 2009 Sep 30. PMID: 19800023.
44. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. Esquela-Kerscher, A e Slack, FJ. Aprile 2006, *Nat Rev Cancer.*, Vol. 6(4), p. 259-69.
45. Sonkoly E, Wei T, Janson PC, Sääf A, Lundeberg L, Tengvall-Linder M, et al. (2007) MicroRNAs: Novel Regulators Involved in the Pathogenesis of Psoriasis? *PLoS ONE* 2(7): e610. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000610>
46. Yu, Z.; Gong, Y.; Cui, L.; Hu, Y.; Zhou, Q.; Chen, Z.; Yu, Y.; Chen, Y.; Xu, P.; Zhang, X.; et al. High-Throughput 471 Transcriptome and Pathogenesis Analysis of Clinical Psoriasis. *J Dermatol Sci* 2020, 98, 109–118, doi:10.1016/j.jderm-472 sci.2020.03.006
47. Interplay between Keratinocytes and Immune Cells--Recent Insights into Psoriasis Pathogenesis - PubMed Avail-502 able online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19027868/> (accessed on 24 October 2022)

48. Deng, Y., Chang, C. & Lu, Q. The Inflammatory Response in Psoriasis: a Comprehensive Review. *Clinic Rev Allerg Immunol* 50, 377–389 (2016). <https://doi.org/10.1007/s12016-016-8535-x>
49. Campanati, A., Orciani, M., Lazzarini, R., Ganzetti, G., Consales, V., Sorgentoni, G., Di Primio, R. and Offidani, A. (2017), TNF- $\alpha$  inhibitors reduce the pathological Th1–Th17/Th2 imbalance in cutaneous mesenchymal stem cells of psoriasis patients. *Exp Dermatol*, 26: 319-324. <https://doi.org/10.1111/exd.13139>
50. Quagliano P, Bergallo M, Ponti R, Barberio E, Cicchelli S, Buffa E, Comessatti A, Costa C, Terlizzi M, E, Astegiano S, Novelli M, Cavallo R, Bernengo M, G: Th1, Th2, Th17 and Regulatory T Cell Pattern in Psoriatic Patients: Modulation of Cytokines and Gene Targets Induced by Etanercept Treatment and Correlation with Clinical Response. *Dermatology* 2011;223:57-67. doi: 10.1159/000330330
51. Huang RY, Li L, Wang MJ, Chen XM, Huang QC, Lu CJ. An Exploration of the Role of MicroRNAs in Psoriasis: A Systematic Review of the Literature. *Medicine (Baltimore)*. 2015 Nov;94(45):e2030. doi: 10.1097/MD.0000000000002030. PMID: 26559308; PMCID: PMC4912302.
52. Gu X, Nylander E, Coates PJ, et al. Effect of narrow-band ultraviolet B phototherapy on p63 and microRNA (miR-21 and miR-125b) expression in psoriatic epidermis. *Acta Derm Venereol* 2011;91:392e7
53. Lovendorf MB, Zibert JR, Gyldenlove M, et al. MicroRNA-223 and miR-143 are important systemic biomarkers for disease activity in psoriasis. *J Dermatol Sci* 2014; 75:133e9
54. A. Pivarcsi, F. Meisgen, N. Xu, M. Stähle, E. Sonkoly, Changes in the level of serum microRNAs in patients with psoriasis after antitumour necrosis factor- $\alpha$  therapy, *British Journal of Dermatology*, Volume 169, Issue 3, 1 September 2013, Pages 563–570, <https://doi.org/10.1111/bjd.12381>
55. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008; 133: 775– 87
56. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 523– 32
57. Abbas AK, Benoist C, Bluestone JA et al Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nat Immunol* 2013; 14: 307– 8
58. Liston A, Gray DHD. Homeostatic control of regulatory T cell diversity. *Nat Rev Immunol* 2014; 14: 154– 65.

59. Szabo PA, Levitin HM, Miron M et al Single-cell transcriptomics of human T cells reveals tissue and activation signatures in health and disease. *Nat Commun* 2019; 10: 4706
60. Ali N, Rosenblum MD. Regulatory T cells in skin. *Immunology* 2017; 152: 372– 81
61. Quaglino P, Ortoncelli M, Comessatti A et al Circulating CD4+CD25 bright FOXP3+ T cells are up-regulated by biological therapies and correlate with the clinical response in psoriasis patients. *Dermatology* 2009; 219: 250– 8
62. Furuhashi T, Saito C, Torii K et al Photo(chemo)therapy reduces circulating Th17 cells and restores circulating regulatory T cells in psoriasis. *PLoS One* 2013; 8:e54895
63. Bovenschen HJ, van Vlijmen-Willems IM, van de Kerkhof PC, van Erp PE. Identification of lesional CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in psoriasis. *Dermatology* 2006; 213: 111– 17
64. Zhang L, Yang XQ, Cheng J et al Increased Th17 cells are accompanied by FoxP3(+) Treg cell accumulation and correlated with psoriasis disease severity. *Clin Immunol* 2010; 135: 108– 17
65. Fujimura T, Okuyama R, Ito Y, Aiba S. Profiles of Foxp3+ regulatory T cells in eczematous dermatitis, psoriasis vulgaris and mycosis fungoides. *Br J Dermatol* 2008; 158: 1256– 63
66. Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E et al Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol* 2005; 174: 164– 73
67. Bjerke JR, Krogh HK, Matre R. Characterization of mononuclear cell infiltrates in psoriatic lesions. *J Invest Dermatol* 1978; 71: 340– 3
68. Zhao M, Wang LT, Liang GP et al Up-regulation of microRNA-210 induces immune dysfunction via targeting FOXP3 in CD4(+) T cells of psoriasis vulgaris. *Clin Immunol* 2014; 150: 22– 30.
69. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 485– 517.
70. Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 337– 48
71. Lee E, Trepicchio WL, Oestreicher JL et al Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris. *J Exp Med* 2004; 199: 125– 30

72. Yawalkar N, Tschanner GG, Hunger RE, Hassan AS. Increased expression of IL-12p70 and IL-23 by multiple dendritic cell and macrophage subsets in plaque psoriasis. *J Dermatol Sci* 2009; 54: 99– 105.
73. Lochner M, Wang Z, Sparwasser T. The special relationship in the development and function of T helper 17 and regulatory T cells. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2015; 136: 99– 129
74. Zhang L, Li Y, Yang X et al Characterization of Th17 and FoxP3(+) Treg cells in paediatric psoriasis patients. *Scand J Immunol* 2016; 83: 174– 80
75. Kannan AK, Su Z, Gauvin DM et al IL-23 induces regulatory T cell plasticity with implications for inflammatory skin diseases. *Sci Rep* 2019; 9: 17675.
76. Shimizu T, Kamata M, Fukaya S et al Anti-IL-17A and IL-23p19 antibodies but not anti-TNFalpha antibody induce expansion of regulatory T cells and restoration of their suppressive function in imiquimod-induced psoriasiform dermatitis. *J Dermatol Sci* 2019; 95: 90– 8
77. Valtriani C., Hurle C.: Citofluorimetria a flusso. Giugno 1997.
78. Altomare GF et al. Psoriasi: Linee guida e raccomandazioni SIDeMaST. In: Linee guida e raccomandazioni SIDeMaST. Pacini ed. 2011 - pp. 29-56.
79. Vlachos, Ioannis S., Konstantinos Zagganas, Maria D. Paraskevopoulou, Georgios Georgakilas, Dimitra Karagkouni, Thanasis Vergoulis, Theodore Dalamagas, and Artemis G. Hatzigeorgiou. "DIANA-miRPath v3. 0: deciphering microRNA function with experimental support." *Nucleic acids research* (2015): gkv403
80. Malara G, Trifirò C, Bartolotta A, Giofrè C, D'Arrigo G, Testa A, De Lorenzo A, Tripepi G. Real-world effectiveness and safety of Guselkumab for the treatment of psoriasis: a 6-month prospective study in a series of psoriatic patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2021 Jan;25(1):406-412. doi: 10.26355/eurev\_202101\_24408.
81. Emmanuel Thomas, Josephine Mistegård, Anne Bregnhøj, Claus Johansen, Lars Iversen Tissue-Resident Memory T Cells in Skin Diseases: A Systematic Review *Int J Mol Sci*. 2021 Aug; 22(16): 9004.
82. Wu R, Zeng J, Yuan J, Deng X, Huang Y, Chen L, Zhang P, Feng H, Liu Z, Wang Z, Gao X, Wu H, Wang H, Su Y, Zhao M, Lu Q. MicroRNA-210 overexpression promotes psoriasis-like inflammation by inducing Th1 and Th17 cell differentiation. *J Clin Invest*. 2018 Jun 1;128(6):2551-2568. doi: 10.1172/JCI97426.
83. Feng H, Wu R, Zhang S, Kong Y, Liu Z, Wu H, Wang H, Su Y, Zhao M, Lu Q. Topical administration of nanocarrier miRNA-210 antisense ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis in mice. *J Dermatol*. 2020 Feb;47(2):147-154. doi: 10.1111/1346-8138.15149.

84. Han Tang 1, Wenrun Zhu 1, Lu Cao 1, Jin Zhang 2, Juncheng Li 1, Duan Ma 2, Changan Guo 1 miR-210-3p protects against osteoarthritis through inhibiting subchondral angiogenesis by targeting the expression of TGFBR1 and ID4. *Front Immunol.* 2022 Sep 29;13:982278. doi: 10.3389/fimmu.2022.982278. eCollection 2022 doi: 10.3389/fimmu.2022.982278. eCollection 2022.
85. Zhou Y, Zhao Z, Yan L, Yang J. MiR-485-3p promotes proliferation of osteoarthritis chondrocytes and inhibits apoptosis via Notch2 and the NF- $\kappa$ B pathway. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2021 Jun;43(3):370-379. doi: 10.1080/08923973.2021.1918150
86. Yu L, Li H, Liu W, Zhang L, Tian Q, Li H, Li M. MiR-485-3p serves as a biomarker and therapeutic target of Alzheimer's disease via regulating neuronal cell viability and neuroinflammation by targeting AKT3. *Mol Genet Genomic Med.* 2021 Jan;9(1):e1548. doi: 10.1002/mgg3.1548.
87. Kang L, Miao Y, Jin Y, Shen S, Lin X. Exosomal miR-205-5p derived from periodontal ligament stem cells attenuates the inflammation of chronic periodontitis via targeting XBP1. *Immun Inflamm Dis.* 2023 Jan;11(1):e743. doi: 10.1002/iid3.743.
88. Che Y, He J, Li X, Wu D, Zhang Y, Yuan G. Overexpression of microRNA-381-3p ameliorates hypoxia/ischemia-induced neuronal damage and microglial inflammation via regulating the C-C chemokine receptor type 2 /nuclear transcription factor-kappa B axis. *Bioengineered.* 2022 Mar;13(3):6839-6855.
89. Kanda N, Hoashi T, Saeki H. The Defect in Regulatory T Cells in Psoriasis and Therapeutic Approaches. *J Clin Med.* 2021 Aug 29;10(17):3880. doi: 10.3390/jcm10173880.

## **Ringraziamenti**

A conclusione di questo elaborato, desidero ringraziare la Prof.ssa Fabiola Oliveri per la sua disponibilità e cordialità e per l'opportunità di partecipare ad un progetto di ricerca tanto stimolante.

Ringrazio la UO di Dermatologia di Ancona, in particolare il Dott. Federico Diotallevi, la Prof.ssa Offidani e la Prof.ssa Campanati che ci hanno coinvolto in questo studio clinico.

Ringrazio inoltre il Prof.re Bonafè e la Prof.ssa Ferracin della UO di Patologia di Bologna per la fondamentale collaborazione.

Infine, ringrazio tutto il laboratorio di Patologia Sperimentale di Ancona, dottorandi, assegnisti e ricercatori, per l'accoglienza e il supporto ricevuti. Un ringraziamento in particolare alla Dott.ssa Giulia Matachione per gli insegnamenti, la premura e il tempo dedicatomi e per la guida fondamentale che è stata in questi mesi.