

Progetto: Angiotensina II e fibrosi renale: ruolo dei microRNA

Autori e Centri partecipanti.

Responsabile Progetto

Dott. Giovanna Castoldi

Clinica Nefrologica, Az. Osp. San Gerardo. Dipartimento Medicina Clinica e Prevenzione. Facoltà
Medicina. Università Milano-Bicocca

Co-Autori

Prof. Andrea Stella

Clinica Nefrologica, Az. Osp. San Gerardo. Dipartimento Medicina Clinica e Prevenzione. Facoltà
Medicina. Università Milano-Bicocca

Dott. Camila Bombardi

Clinica Nefrologica, Az. Osp. San Gerardo. Dipartimento Medicina Clinica e Prevenzione. Facoltà
Medicina. Università Milano-Bicocca

Dott. Barbara Corradi

Clinica Nefrologica, Az. Osp. San Gerardo. Dipartimento Medicina Clinica e Prevenzione. Facoltà
Medicina. Università Milano-Bicocca

Dott. Gianpaolo Zerbini

Unità Complicanze del Diabete, Divisione di Scienze Cardiovascolari e Metaboliche, Istituto
Scientifico San Raffaele, Milano

Dott. Cira di Gioia

Dipartimento di Scienze Radiologiche, Oncologiche ed Anatomico Patologiche, Sapienza Università
di Roma.

Angiotensina II e fibrosi renale: ruolo dei microRNA

Background

Il sistema renina-angiotensina svolge un ruolo fondamentale nella regolazione della pressione arteriosa e dell'omeostasi cardiovascolare (1,2). Attualmente, i farmaci che agiscono sul sistema renina-angiotensina rappresentano la terapia di scelta per ridurre sia gli eventi cardiovascolari, che la progressione delle nefropatie, indipendentemente dall'eziologia della patologia sottostante (ipertensione arteriosa, diabete etc.) (3,4). È noto che l'angiotensina II (Ang II), principale effettore del sistema renina-angiotensina, oltre ai ben noti effetti emodinamici, possiede molteplici azioni a livello tissutale. Infatti, l'Ang II può essere considerata una citochina coinvolta in processi di crescita cellulare, aterotrombosi, apoptosi e infiammazione (5). In particolare, l'Ang II svolge un importante ruolo nei processi di rimodellamento tissutale, promuovendo la sintesi e la deposizione delle proteine della matrice extracellulare in diversi organi, come il cuore, i vasi, e il rene, favorendo lo sviluppo di fibrosi (5,6). Il rimodellamento tissutale rappresenta un processo dinamico, che dipende dall'equilibrio tra sintesi e degradazione del collagene e delle proteine della matrice. Ang II modula l'espressione e l'attività delle metalloproteasi (MMPs), i principali enzimi coinvolti nella degradazione del collagene (7), la cui attività è finemente regolata da inibitori tissutali endogeni (TIMPs). In modelli sperimentali di ipertensione arteriosa è stato dimostrato che l'angiotensina II aumenta l'espressione di TIMP-1 (8) e TIMP-2 (9), i principali inibitori endogeni delle metalloproteasi. Di conseguenza, l'Ang II modula un complesso pattern di espressione di geni che sono coinvolti nello sviluppo di fibrosi, che rappresenta il denominatore comune del danno d'organo, sia a livello cardiovascolare che renale (10). La prevenzione e/o regressione del danno d'organo resta attualmente un problema aperto.

I molteplici effetti mediati dall'Ang II richiedono una dinamica modulazione dell'espressione genica, che è stata studiata negli anni scorsi con diverse tecniche di espressione differenziale

(11,12). Questi approcci di espressione genica differenziale si sono mostrati utili per identificare nuovi geni che non si sapeva fossero modulati dall' angiotensina II (12-14). In generale, gli studi di espressione genica differenziale, pur fornendo un' ampia panoramica di geni potenzialmente coinvolti nelle patologie, non permettono di chiarirne i meccanismi di regolazione e la conseguente traduzione proteica. Nel presente contesto, la conoscenza dei meccanismi intracellulari-angiotensina mediati permetterebbe, da una parte, di chiarire l' intera sequenza di eventi che legano l' angiotensina II allo sviluppo di fibrosi, e dall' altra, di porre le basi per una appropriata strategia di rallentamento/regressione della fibrosi.

I microRNA (miRNAs), piccole molecole di RNA, endogeni e altamente conservati, rappresentano i principali regolatori dell' espressione genica. I miRNA sono formati da 20-26 nucleotidi, non codificanti, che vengono inizialmente trascritti dalla RNA polimerasi II nel nucleo, partendo da un I micro RNA maturi possono bloccare la traslazione delle proteine quando si legano al 3'UTR dell' mRNA con un appaiamento non perfettamente complementare, o possono promuovere la degradazione dell' RNA messaggero quando l' appaiamento miRNA-mRNA e' perfettamente complementare (15).

Ogni miRNA puo' regolare decine e centinaia di geni target, che possono essere predetti utilizzando come primo approccio diversi software bioinformatici, ma che devono necessariamente essere confermati sperimentalmente.

Attualmente, gli effetti dell' angiotensina II sui microRNA sono poco conosciuti. In particolare, non e' noto se i microRNA possano modulare gli effetti profibrotici dell' angiotensina II.

Un importante ruolo nello sviluppo di fibrosi in diversi organi e' stato dimostrato per la famiglia dei miR-29 (18), che hanno come target specifici alcune proteine coinvolte nei processi fibrotici, come il collagene 1A1 (Col1A1) (18-20), il principale tipo di collagene presente nel miocardio.

In un modello sperimentale di ipertensione arteriosa angiotensina II dipendente abbiamo recentemente dimostrato che nel miocardio la down-regolazione di mir-29b e di mir-133a, che svolge un ruolo principale nello sviluppo di ipertrofia miocardica (21), si accompagna a fibrosi miocardica, caratterizzata da una netta prevalenza di fibre collagene di tipo I (22). Utilizzando esperimenti di luciferasi abbiamo confermato sperimentalmente che il collagene 1A1 e' un target effettivo non solo di mir-29b, ma anche di miR-133a, suggerendo per mir-133a un ruolo nello sviluppo di fibrosi miocardica nell' ipertensione angiotensina II dipendente, attraverso la modulazione del collagene 1A1 (22).

Scopi della Ricerca

Gli obbiettivi di questo progetto sono:

- 1) indagare l' espressione differenziale renale dei microRNA, separatamente a livello glomerulare e tubulointerstiziale, in un modello sperimentale animale (ratto) di ipertensione arteriosa angiotensina dipendente.
- 2) studiare in vivo il ruolo dei microRNA differenzialmente espressi nel nostro modello e il ruolo dei corrispondenti selezionati geni target, previa conferma sperimentale con esperimenti di luciferasi, sulla progressione del danno renale (albuminuria, velocita' di filtrazione glomerulare e fibrosi renale glomerulare, tubulo-interstiziale e perivascolare).
- 3) valutare il ruolo dei microRNA differenzialmente espressi nello sviluppo della transizione epitelio-mesenchimale indotta dall' angiotensina II in cellule tubulari umane, processo fondamentale per lo sviluppo di fibrosi.

Metodi

Modello sperimentale di ipertensione angiotensina-dipendente

Gli esperimenti saranno eseguiti in ratti Sprague Dawley maschi, consci, di 12 settimane di età (n=12 per gruppo, 200-250 g peso corporeo). I ratti verranno stabulati in gabbie metaboliche, a temperatura controllata, con un ciclo di 12 ore di luce-buio. Dopo 4 giorni di ambientamento, i ratti saranno anestetizzati (pentobarbital sodico 40mg/kg/i.p.) e verrà impiantata sottocute una minipompa osmotica (ALZET 2001, ALZET 2004) in regione infrascapolare per permettere il rilascio di Ang II al dosaggio di 200ng/kg/min per 1 (breve termine) e 4 settimane (lungo termine), o di salina (corrispondenti gruppi controllo). Una volta ogni tre giorni per il gruppo che sarà trattato per 1 settimana, e una volta ogni 7 giorni per il gruppo che sarà trattato per 4 settimane, si misureranno i seguenti parametri: peso corporeo, diuresi, escrezione urinaria di albumina nelle 24 ore (Nephurat, Elisa), pressione arteriosa (tail cuff, BP Recorder, Ugo Basile), e la velocità di filtrazione glomerulare (clearance della creatinina) (Figura 1).

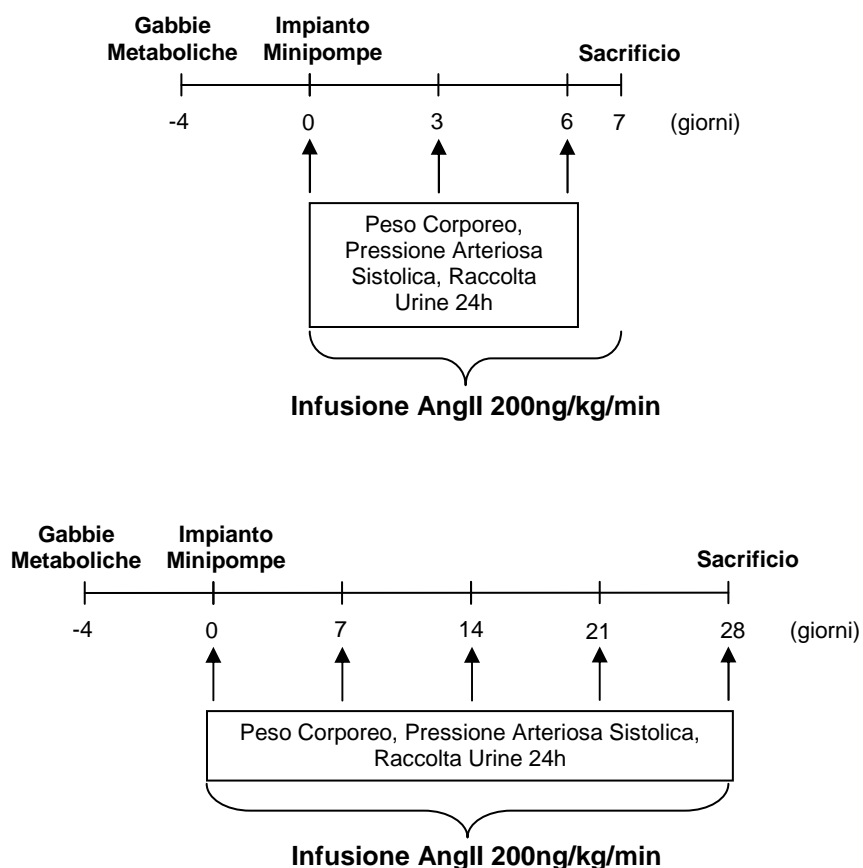


Figura 1: disegno protocollo sperimentale

Quantizzazione della fibrosi renale

Al termine del periodo sperimentale i ratti saranno sacrificati e verranno prelevati i reni, che saranno immediatamente fissati in formalina 10%, e successivamente sezionati, con unico taglio centrale longitudinale passante per l'ilo renale, ed inclusi in blocco di paraffina. Sezioni dello spessore di 4 µm saranno colorate con ematossilina-eosina e con il PAS per la valutazione istologica, e con rosso sirio, colorazione specifica per il collagene, per la valutazione istomorfometrica della fibrosi in tre sedi specifiche: glomerulare, tubulo-interstiziale e perivascolare. Una serie di immagini (5 Mp, JPG files) delle sezioni istologiche di ciascun rene esaminato, codificato per ciascuna sede, saranno acquisite con macchina fotografica digitale collegata al microscopio ottico (Leica) tramite sistema SPOT Diagnostic Instruments (Sterling Heights, MI, USA), e analizzate con software specifico per analisi di immagini (Methamorph 6.2, UIC), per la quantizzazione del collagene glomerulare, tubulo-interstiziale, e perivascolare. La valutazione istologica ed istomorfometrica sarà condotta da due patologi non informati del trattamento degli animali. Per la valutazione della fibrosi glomerulare e tubulo-interstiziale le immagini saranno acquisite da una visione al microscopio ottico con un obiettivo 20X ; per la fibrosi perivascolare si utilizzerà l'obiettivo 40X.

Per la valutazione del collagene glomerulare, per ciascun rene saranno selezionati manualmente in modalità random, sulla sezione istologica colorata con il rosso sirio, 20 glomeruli per il calcolo in automatico della percentuale dell'area occupata dal tessuto collagene colorato specificamente in rosso in ciascun glomerulo selezionato (modalità semi-automatica)

Per la valutazione del collagene tubulo-interstiziale, per ciascun rene saranno selezionati in modalità random, sulla sezione istologica colorata con il rosso sirio, 20 campi di tubuli ed interstizio, in assenza di glomeruli e vasi, per il calcolo in automatico della percentuale dell'area occupata dal tessuto collagene colorato specificamente in rosso (modalità automatica).

Per la valutazione del tessuto collagene perivascolare, per ciascun rene saranno selezionati manualmente in modalità random 10 vasi di pari calibro sulla sezione istologica colorata con il

rosso sirio. Solo il collagene immediatamente intorno a ciascun vaso intraparenchimale sarà considerato rappresentativo del collagene perivascolare, che verrà espresso come rapporto tra area del collagene perivascolare ed area del lume del vaso selezionato.

Raccolta di glomeruli e tubuli con la Laser Capture Microdissection

Dato che il rene è composto da strutture molto diverse tra loro, useremo la Laser Capture Microdissection (Cell Cut MMI System. LCM) per raccogliere direttamente i glomeruli e i tubuli dalle sezioni congelate dei reni. La LCM infatti permette di isolare e delimitare precisamente popolazioni cellulari o strutture da sezioni di tessuto eterogeneo. Si eseguiranno al criostato sezioni di spessore di 10- μ m di tessuto renale congelato, che saranno poste su speciali vetrini di 2- μ m di spessore (MMI AG, Glottbrugg, Switzerland). Dai glomeruli e tubuli separatamente raccolti si provvederà ad estrarre micro-RNA e RNA totale.

Profili di espressione dei microRNA

- Estrazione microRNA: per poter procedere all'arricchimento degli small RNA partendo dall'estrazione dell'RNA si utilizzerà il mirVana miRNA Isolation kit (Ambion). Questo sistema si avvale di un metodo basato su filtro di fibra di vetro per l'isolamento di RNA piccoli, come miRNA, small interfering RNA (siRNA) e small nuclear RNA (snRNA), da tessuti e cellule, e permette l'arricchimento della popolazione di RNA di dimensione minore o uguale a 200 basi, aumentando la sensibilità della detection di small RNA.

Per isolare l'RNA totale si aggiunge ad un terzo della fase acquosa contenete l'RNA, etanolo 100%, che permette all'RNA di rimanere intrappolato nella fibra di vetro e agli RNA di piccola dimensione di venire eluiti nel filtrato. A questo punto, aggiungendo ulteriore etanolo al filtrato, fino ad un rapporto di due terzi, il campione viene nuovamente filtrato permettendo agli smallRNA di rimanere intrappolati al filtro.

Dopo ripetuti lavaggi è possibile staccare dalla maglia di vetro l'RNA totale e gli smallRNA che possono essere conservati a -20°C.

L'espressione dei microRNA sarà valutata utilizzando le Card Applied Biosystems. Tale sistema si basa su analisi di PCR quantitativa per la forma matura, biologicamente attiva dei microRNA noti e depositati presso il registro Sanger. I saggi TaqMan per miRNA sono estremamente sensibili, e sono sufficienti 1–10 ng di smallRNA estratto, per permettere una loro analisi. Dopo la preparazione di pool di retrotrascrizione dei 384 microRNA presenti nelle card, che avviene con l'impiego di un primer altamente specifico per ogni singolo microRNA, il retrotrascritto viene caricato sull'array contenente 384 pozzetti. In ciascun pozzetto sono presenti in forma liofila le sonde e i primers necessari per la reazione di qPCR per ciascun microRNA. Per i nostri esperimenti utilizzeremo il TaqMan® MicroRNA Assays Mouse and Rat Panel – Early Access Kit, che include 303 saggi miRNA specifici per solo ratto. Il pannello copre la maggioranza di miRNA murini attualmente identificati nel Sanger miRNA Registry (<http://microrna.sanger.ac.uk>). Come controllo positivo utilizzeremo RNU6B. I saggi MicroRNA TaqMan saranno eseguiti mediante l'impiego di ABI PRISM 7900 HT Sequence Detection System. L'espressione differenziale dei miRNA sarà valutata con il metodo del $\Delta\Delta CT$ (Data ASSIST V 2.0. Applied Biosystem)

Per una preliminare predizione dei geni target dei microRNA differenzialmente espressi, verranno impiegati tre differenti algoritmi: miRanda (<http://microrna.sanger.ac.uk/target/v4>), PicTar (<http://pictar.bio.nyu.edu>), Targetscan (<http://targetscan.org>). L'espressione differenziale sarà confermata con real time PCR. Per ogni mir differenzialmente espresso verranno identificati target potenzialmente coinvolti nei meccanismi di rimodellamento tissutale, che saranno poi confermati sperimentalmente con luciferasi assay, prima di procedere con l'analisi del ruolo dei specifici geni target.

Colture di cellule tubulari renali

Frammenti di tessuto corticale di rene umano, ottenuto da nefrectomie, verra' utilizzato per estrarre cellule tubulari (23). Glomeruli e tubuli verranno isolati tramite l'uso di filtri metallici a maglie progressivamente piu' strette; in questo modo i glomeruli e i tubuli resteranno al di sopra dell'ultimo filtro mentre i detriti ed i globuli rossi passeranno oltre e potranno essere eliminati. Tubuli e glomeruli verranno poi digeriti con collagenasi (type IV, 750U/ml) e posti in coltura in RPMI con 20% fetal calf serum, 5 µg/ml insulina, 5µg/ml transferrina, 20 ng/ml selenio, 100 U/ml penicillina, 100 µg/ml streptomicina. Le cellule tubulari crescono dopo 7-10 giorni in coltura. I tubuli non aderenti verranno rimossi con lavaggi mentre le cellule aderenti verranno ulteriormente coltivate nello stesso medium. Le cellule tubulari (piccole cellule cuboidi) verranno caratterizzate per la morfologia e con l' uso di anticorpi specifici. Le cellule tubulari risultano positive per citocheratina-18 e negative per il fattore di Von Willebrand, permettendo di escludere contaminazioni di cellule endoteliali..

Le cellule cresceranno a 37°C in presenza di umidita' al 95% e 5% CO₂, fino a confluenza (80%), lavate con PBS due volte e incubate in serum free (SF) medium per 48h. Le cellule verranno nuovamente lavate con PBS e mantenute in SF medium con o senza Ang II (1X10⁻⁷) per 5 giorni. Per ottenere la transizione epitelio-mesenchimale, l' angiotensina II verra' aggiunta al medium ogni giorno.

La funzione biologica dei microRNA differenzialmente espressi verra' indagata mediante knockout o overespressione degli specifici microRNA, in relazione al loro comportamento.

In questo contesto ci si propone di verificare se la down-regulation o la over-espressione dei microRNA, confermati sperimentalmente come differenzialmente espressi, svolgono un ruolo nella transizione epitelio-mesenchimale, e, di conseguenza, nello sviluppo di fibrosi..

Risultati preliminari

Laser capture microdissection e microRNA microarray: Abbiamo eseguito esperimenti pilota per ottimizzare l' estrazione di mRNA e miRNA da materiale ottenuto con la laser capture microdissection. Sono state eseguite al criostato sezioni di spessore di 10- μ m di tessuto renale congelato. Le sezioni sono state poste su speciali vetrini di 2- μ m di spessore (MMI AG, Glottbrugg, Switzerland). Sono stati raccolti 100 glomeruli e 100 tubuli con LCM (Figura 2 e 3). Glomeruli e tubuli sono stati identificati e tagliati ad un ingrandimento 200X e raccolti per adesione al tappo della provetta di raccolta in condizioni RNAase free. Sui glomeruli raccolti, seguendo il protocollo descritto nei Metodi-Profilo di espressione dei microRNA, e' stata eseguita una analisi preliminare per valutare l' espressione dei microRNA (Figura 4).

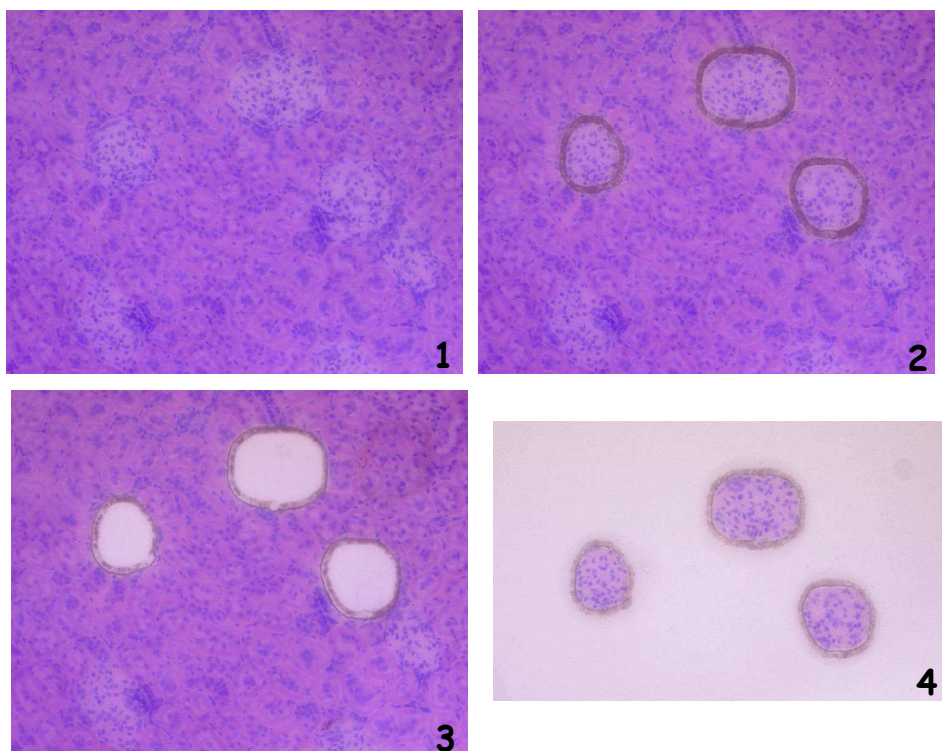


Figura 2: raccolta di glomeruli con Laser Capture Microdissection.
1. selezione glomeruli; 2. taglio con laser; 3. prelievo glomeruli;
4. raccolta glomeruli isolati.

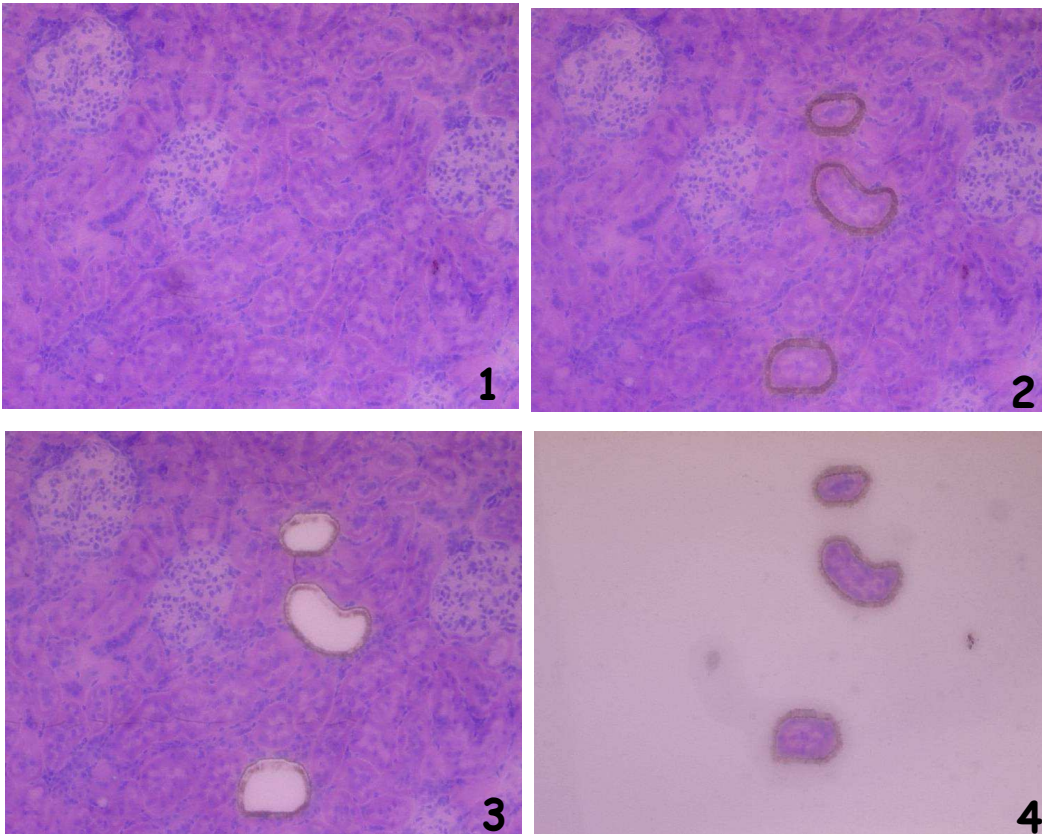


Figura 3: raccolta dei tubuli renali con Laser Capture Microdissection.
 1. selezione tubuli; 2. taglio con laser; 3. prelievo tubuli; 4. raccolta tubuli isolati

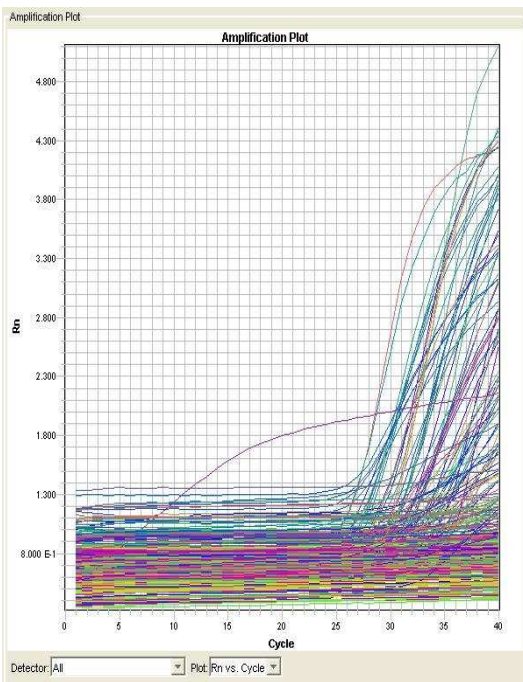


Figura 4: espressione dei microRNA (MicroRNA assay. Card A) nei glomeruli raccolti con Laser Capture Microdissection

Quantizzazione fibrosi renale: Uno studio preliminare ha permesso di mettere a punto la tecnica di quantizzazione del tessuto fibroso, previa colorazione con rosso sirio, nelle diverse strutture renali, in modo da valutare separatamente la fibrosi perivascolare dei piccoli vasi intraparenchimali renali, la fibrosi tubulo-interstiziale, e la fibrosi glomerulare. A tale scopo gli stessi vetrini utilizzati per la valutazione della fibrosi verranno analizzati con il microscopio a luce polarizzata, che permette di distinguere in base alla colorazione i diversi tipi di fibre collagene (24).

Transizione epitelio-mesenchimale: Abbiamo eseguito esperimenti per valutare in vitro la transizione epitelio-mesenchimale in cellule tubulari renali umane primarie stimulate con Ang II, facendo esperimenti di time-course e dose-risposta. La stimolazione con Ang II alla concentrazione di 1×10^{-7} per 5 giorni promuove la transizione epitelio-mesenchimale con una evidente espressione della α -smooth muscle actin (Figure 5), marker di cellule mesenchimali, che non viene espressa fisiologicamente nelle cellule dell' epitelio tubulare. Le stesse cellule presentano una down regolazione della e-cadherin, che invece e' espressa normalmente nelle cellule tubulari.

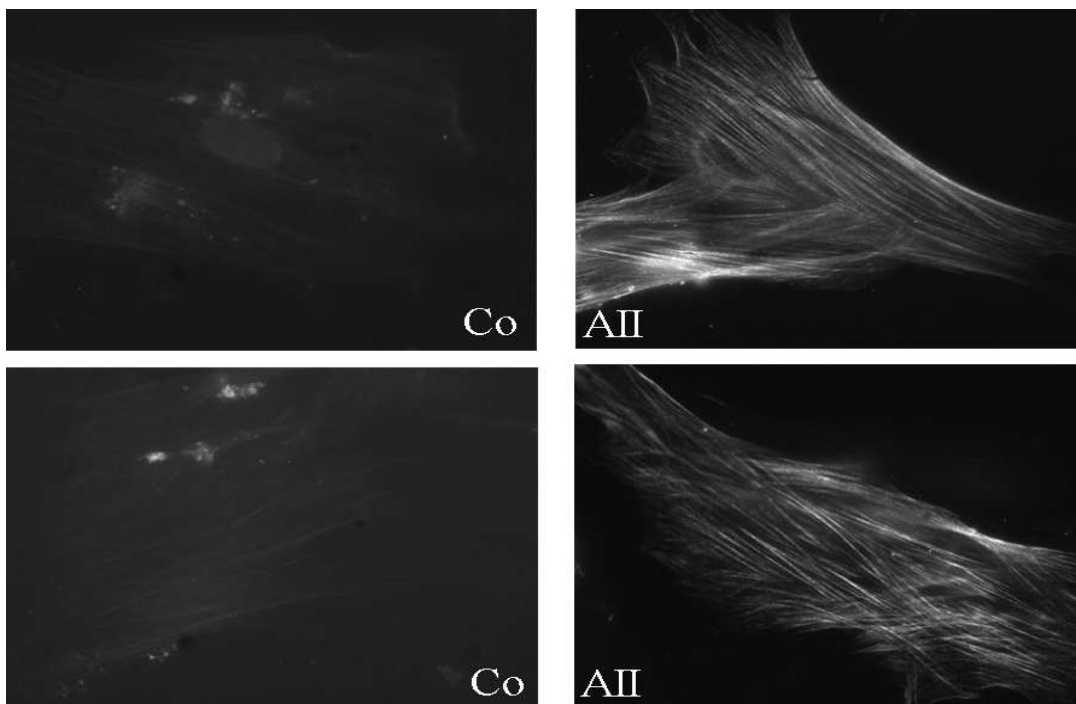


Figura 5: Cellule epiteliali tubulari (Co, controllo): assenza del segnale di α -smooth muscle actin. Cellule epiteliali tubulari stimulate con Ang II (AII): sono visibili i filamenti di actina.

Risultati attesi

In base ai dati presenti in letteratura e' possibile ipotizzare che i microRNA svolgano un ruolo chiave nella regolazione dei geni coinvolti nel danno renale (25). Il presente studio si propone di indagare il ruolo dei microRNA a livello renale in un modello sperimentale di ipertensione angiotensina II dipendente.

L'utilizzo della Laser Capture Microdissection, associata all'analisi di espressione differenziale dei microRNA permetterà di differenziare nel distretto glomerulare e tubulo interstiziale i potenziali microRNA coinvolti nello sviluppo di danno renale, che sarà analizzato in modo differenziale (glomeruli, tubulo-interstizio e vasi) con tecniche istomorfometriche.

Esperimenti in vitro su cellule tubulari renali stimolate con angiotensina II permetteranno di valutare il ruolo dei microRNA, che risultano differenzialmente espressi in vivo nel tessuto renale nell'ipertensione Ang II dipendente, nella transizione epitelio-mesenchimale, meccanismo alla base dello sviluppo di fibrosi.

L' identificazione del ruolo dei microRNA implicati nella transizione epitelio-mesenchimale potrebbe rappresentare un importante target farmacologico per bloccare, o almeno rallentare, questo processo.

Sviluppi futuri del progetto prevedono lo studio *in vivo* di diversi trattamenti (bloccante recettore AT1 e angiotensina a dosaggio non ipertensivo) per valutare se l'effetto dell'Angiotensina II sui microRNA differenzialmente espressi sia mediato dall' azione diretta sui recettori AT1, o sia mediato dall'aumento dei valori di pressione arteriosa dovuti all' angiotensina stessa.

Bibliografia

1. Sealey, J.E., Laragh, J.H. (1995) The renin-angiotensin-aldosterone system for normal regulation of blood pressure and sodium and potassium homeostasis. *Hypertension. Pathophysiology, diagnosis and management. Vol II: 1763-1796.*
2. Zanchetti, A. Stella, A. (1999) Cardiovascular disease and the kidney: an epidemiologic overview. *J Cardiovasc Pharmacol. 33 Suppl 1:S1-6*
3. Ferrari, P. (2007) Prescribing angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers in chronic kidney disease. *Nephrology 12, 81-89*
4. Mancia, G., De Backer, G., Dominiczak, A., Cifkova, R., Fagard, R., Germano, G., Grassi, G., Heagerty, A. M., Kjeldsen, S. E. and Laurent, S. (2007) 2007 ESH-ESC Practice Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: ESH-ESC Task Force on the Management of Arterial Hypertension. *J. Hypertens. 25, 1751-1762*
5. Dzau, V.J. (2001) Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease. A unifying hypothesis. *Hypertension. 37, 1047-1052.*
6. Ruperez, M., Lorenzo, O., Blanco-Colio, L.M., Esteban, V., Egido, J., Ruitz-Ortega, M. (2003) Connective tissue growth factor is a mediator of angiotensin II-induced fibrosis. *Circulation. 108: 1499-1505.*
7. Brew, K., Dinakarpanian, D., Nagase H. (2000) Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta. 1477: 267-283.*
8. Castoldi, G., di Gioia, CRT., Pieruzzi, F., D' Orlando, C., van de Greef, WMM., Busca, G., Sperti, G., Stella, A. (2003) ANG II increases TIMP-1 expression in rat aortic smooth muscle cells in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol. 284: H635-H643.*
9. Castoldi, G., di Gioia, CRT., Travaglini C., Busca G., Redaelli S., Bombardi C., Stella A. (2007) Angiotensin II increases tissue-specific inhibitor of metalloproteinase-2 expression in rat aortic smooth muscle cells in vivo: evidence of a pressure-independent effect. *Clin Exp Pharmacol Physiol 34(3): 205-209.*

10. Ma, L., Fogo, A.,B. (2007). Modulation of glomerulosclerosis. *Semin Immunopathol.* 29, 385-395.
11. Campos, A.H., Zhao,Y., Pollman, M.J., Gibbons, G.H. (2003). DNA microarray profiling to identify angiotensin-responsive genes in vascular smooth muscle cells: potential mediators of vascular disease. *Circ Res* 92:111-118.
12. di Gioia, C.R.T., van de Greef, W., Sperti, G., Castoldi, G., Todaro, N., Ierardi, N., Pieruzzi, F., Stella, A. (2000) Angiotensin II increases calponin expression in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 279, 965-969.
13. Castoldi, G., di Gioia, C.R., Pieruzzi, F., van De Greef, W.M., Busca, G., Sperti G, Stella A. (2001) Angiotensin II modulates calponin gene expression in rat vascular smooth muscle cells in vivo. *J Hypertens*19(11):2011-8.
14. Castoldi G., Redaelli S., van de Greef, W., di Gioia C.R.T., Busca G., Sperti, G., Stella, A. (2005) Angiotensin II modulates frizzled-2 receptor expression in rat vascular smooth muscle cells. *Clin Sci.* 108(6), 523-530.
15. Bartel D.P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281-297.
16. Van Rooij E, Olson EN. (2007) MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *J Clin Invest* 117:2369-2376.
17. Zeng Y. (2006) Principles of micro-RNA production and maturation. *Oncogene* 25:6156-6162.
18. Van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, Hill JA, Olson EN. (2008). Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci* 105:13027-13032.
19. Liu Y, Taylor NE, Lu L, Usa K, Cowley AW Jr, Ferreri NR, Yeo NC, Liang M. (2010) Renal medullary microRNAs in Dahl salt-sensitive rats: miR-29b regulates several collagens and related genes. *Hypertension* 55:974-982.

20. Maurer B, Stanczyk J, Jünger A, Akhmetshina A, Trenkmann M, Brock M, Kowal-Bielecka O, Gay RE, Michel BA, Distler JH, Gay S, Distler O. (2010) MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 62:1733-1743.
21. Carè A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P, Bang ML, Segnalini P, Gu Y, Dalton ND, Elia L, Latronico MV, Høydal M, Autore C, Russo MA, Dorn GW 2nd, Ellingsen O, Ruiz-Lozano P, Peterson KL, Croce CM, Peschle C, Condorelli G. (2007) MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med*.13(5):613-8.
22. Castoldi G, di Gioia C, Bombardi C, Corradi B, Catalucci D, Gualazzi MG, Mancini M, Leopizzi M, Zerbini G, Condorelli G, Stella A. (2010) Mir 133a modula il collagene 1a1 nel miocardio di ratto in un modello di ipertensione angiotensina dipendente. Abstract. 27° Congresso Società Italiana dell'Ipertensione Arteriosa, Roma.
- 23 . Maestroni A, Ruggieri D, Dell'Antonio G, Luzi L, Zerbini G. (2005) C-peptide Increases the Expression of Vasopressin-Activated Calcium-Mobilizing Receptor (VACM-1) Gene Through a G Protein Dependent Pathway. *Eur J Endocrinol*. 152:135-41.
24. Castoldi G, di Gioia CR, Bombardi C, Perego C, Perego L, Mancini M, Leopizzi M, Corradi B, Perlini S, Zerbini G, Stella A. (2009) Prevention of myocardial fibrosis by N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline in diabetic rats. *Clin Sci (Lond)* 118(3):211-20.
25. Li JY, Yong TY, Michael MZ, Gleagle JM. (2010) Review: The role of microRNAs in kidney disease. *Nephrology (Carlton)*15(6):599-608.

Progetto: Angiotensina II e fibrosi renale: ruolo dei microRNA.

Crono programma

I° anno

Primo semestre:

- esecuzione esperimenti di infusione di angiotensina II nei modelli animali.
- dosaggi microalbuminuria e filtrato glomerulare.
- analisi istomorfometrica della fibrosi renale (glomerulare, tubulointerstiziale, perivascolare).

Secondo semestre:

- utilizzo della Laser Capture Microdissection per raccolta di tubuli e glomeruli renali.
- analisi (microarray) della espressione differenziale dei microRNA sui glomeruli e tubuli e successive conferme con real-time PCR.

II° anno

Primo semestre:

- colture cellule tubulari per esperimenti di transizione epitelio-mesenchimale. Esperimenti di over-espressione e silenziamento dei microRNA risultati differenzialmente espressi.
- valutazione dei geni target dei microRNA differenzialmente espressi. Esperimenti di luciferasi.

Secondo semestre:

- Studio in vivo nei modelli animali dei geni target dei microRNA differenzialmente espressi
- Analisi definitiva dei dati raccolti e preparazione manoscritto.

Lab facilities.

La ricerca sarà eseguita presso Laboratorio di Fisiopatologia Cardio-Renale del Dipartimento di Medicina Clinica e Prevenzione. Facoltà Medicina. Università Milano-Bicocca.

Il Dipartimento di Medicina Clinica e Prevenzione (DIMEP, Monza, Edificio U8) è uno dei Quattro Dipartimenti della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università di Milano-Bicocca.

Nella struttura sono presenti numerose facilities per biologia molecolare, biochimica, e genomica e uno stabulario. Il Dipartimento si trova vicino all'Ospedale San Gerardo.

Il laboratorio di ricerca è adeguatamente equipaggiato per studi di biologia molecolare e cellulare, e comprende la seguente strumentazione:

- Strumentazione per PCR :

- TaqMan ABI PRISM 7900 FAST (Applied Biosystems)
- Peltier thermal cycler DNA Engine (MJ Research)

- Laser capture microdissection:

- MMICut Laser Microdissection System (MMI AG, Glottbrugg, Switzerland)

- Microscopia

a microscopy for cell culture, immunohistochemical and immunofluorescence studies equipped with an acquisition system (Nikon); an imaging analysis software (Metamorph 6.2)

- Colture cellulari

- safety cabinets with vertical laminar air flow (BIOAIR);
- CO₂ incubator (Celbio)
- refrigerated centrifuge (Celbio).

- Biochemical instruments: apparatus for SDS-PAGE and western blotting.

- Gabbie metaboliche per ratti (n=50)

- Non Invasive Blood Pressure Recorder, Ugo Basile Instruments.