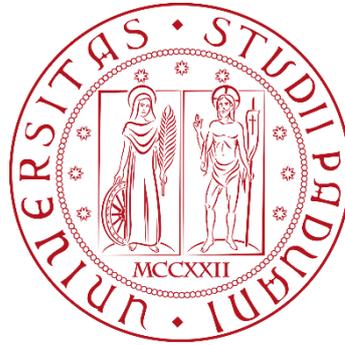


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea triennale in Biotecnologie**



**ELABORATO DI LAUREA**

**Coinvolgimento dei microRNAs nella  
regolazione sistemica dell'invecchiamento**

**Involvement of microRNAs in systemic regulation of  
ageing**

**Relatore: Prof. Stefano Cagnin**

**Dipartimento di Biologia**

**Laureanda: Beatrice Brioni**

**ANNO ACCADEMICO 2023/2024**



## INDICE

<b>1. ABSTRACT .....</b>	<b>2</b>
<b>2. INTRODUZIONE .....</b>	<b>3</b>
2.1 Descrizione del fenomeno di invecchiamento: come i tessuti si modificano .....	3
2.2 Biologia molecolare dell'invecchiamento .....	5
2.3 Gli RNA non codificanti: ncRNAs e miRNAs .....	9
2.3.1 I microRNAs (miRNAs).....	10
2.4 Gli RNA non codificanti nell'invecchiamento .....	12
<b>3. MATERIALI, METODI E RISULTATI .....</b>	<b>14</b>
3.1 Sequenziamento bulk dell'RNA e proteomica dei campioni della coorte <i>TMS</i> .....	14
3.2 Analisi dei campioni della coorte <i>TMS</i> .....	18
3.3 sc-RNAseq da campioni di parabiosi eterocronica.....	24
3.4 Linee cellulari HEK 293T .....	28
3.5 Test ad alto rendimento con plasmide di espressione di miR-29 e plasmidi reporter 3'UTR.....	28
3.6 miRNAs locali e miRNAs globali .....	29
3.7 I miRNAs circolanti dell'invecchiamento globale .....	33
<b>4. DISCUSSIONE.....</b>	<b>37</b>
4.1 L'espressione della famiglia di miRNAs circolanti miR-29 aumenta con l'invecchiamento .....	37
<b>5. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>40</b>

## 1. ABSTRACT

L'invecchiamento di cellule, tessuti e interi organismi viene regolato da meccanismi molecolari la cui comprensione permette di individuare non solo i fattori di rischio, ma anche i rispettivi *targets* terapeutici.

In questo studio, si è generata una mappa di espressione di ncRNAs durante l'invecchiamento e il ringiovanimento nei topi eterocronici, confrontata con ncRNAs mappati in topi invecchiati sani provenienti dalla *Tabula Muris Senis (TMS)*.

I ncRNAs, infatti, che includono anche i microRNAs, possono regolare il compattamento cromatinico, la memoria epigenetica, la trascrizione, lo *splicing*, l'*editing* e la traduzione dell'RNA, accoppiandosi con sequenze complementari nucleotidiche, e per questa ragione la degradazione anomala di determinati miRNAs può configurarsi come fattore di invecchiamento ed essere implicata nell'insorgenza di alcune patologie.

Nel lavoro discusso sono stati isolati, sequenziati e catalogati i miRNAs in base alla correlazione con l'invecchiamento tessuto-specifica o sistemica. In particolare, il miR-29c-3p è correlato con l'invecchiamento negli organi solidi e lo si trova sia nel plasma che nelle vescicole extracellulari (*EVs*).

Tramite ciò, si è compreso come esperimenti di parabiosi eterocronica, procedimento chirurgico tramite cui si uniscono i sistemi vascolari di due animali vivi di età diverse per studiare meccanismi d'azione di fattori circolanti (miRNAs), potessero invertire parzialmente l'aumento di espressione dei miRNAs coinvolti nell'invecchiamento.

## **2. INTRODUZIONE**

### **2.1 Descrizione del fenomeno di invecchiamento: come i tessuti si modificano**

L'invecchiamento nell'uomo è un processo fisiologico e mutabile nel tempo. In accordo con la maggior parte dei gerontologi, inizia nella quarta decade di vita e termina con il decesso dell'individuo.

Il processo di invecchiamento umano è complesso e pertinente a diverse sfere, da quella biologica, a quella psicologica e sociale.

L'invecchiamento è caratterizzato da una progressiva perdita di funzionalità fisiologica, che porta alla compromissione di funzionalità legate anche al metabolismo e alle proprietà chimico-fisiche delle cellule, con un conseguente danneggiamento dell'autoregolazione, della rigenerazione, della struttura e della funzione stessa cellulare, quindi anche tissutale; tutto ciò, può ulteriormente influenzare l'umore, l'atteggiamento verso l'ambiente, l'attività sociale, e in generale provocare un invecchiamento psichico, contraddistinto dalla capacità, o meno, di adattabilità al processo stesso di invecchiamento. Nonostante sia un processo naturale e irreversibile, può decorrere secondo una natura topica ma anche patologica, sulla base dell'aspetto eziologico-patologico del codice genetico.

I cambiamenti strutturali più evidenti dell'invecchiamento riguardano:

- Lenta atrofia di tessuti e organi, che porta infine alla morte;
- Degenerazione polimorfica amiloide (in aree di tessuto in cui si trovano depositi di amiloide) e lipofuscinoide (nel citoplasma delle cellule degli organi solidi, in cui la lipofuscina, "pigmento senile", si accumula);
- Disidratazione cellulare interna ed esterna, per cui il volume totale di liquidi corporei si riduce dal 60% del peso corporeo nei giovani e adulti, a circa il 45% del peso corporeo negli anziani;
- Aumento del grasso e riduzione del tessuto muscolare.

L'invecchiamento biologico, tuttavia, può procedere anche come invecchiamento patologico: mentre quello sano si verifica quando è esente da malattie o fattori noti come predittori, ed è contraddistinto da deficit progressivi ed equamente distribuiti nel tempo e nell'organismo, l'invecchiamento patologico rappresenta un deterioramento rapido di molte funzioni vitali del corpo, il che porta a morte prematura. I cambiamenti fisiologici, coerentemente, si sviluppano non uniformemente nei vari organi e anche a ritmi diversi. Per quanto riguarda il sistema cardio-circolatorio, si verifica una diminuzione della velocità di conduzione dei cardiomiociti, ipertrofia del ventricolo sinistro, fibrosi della valvola e apparato mitralico, espansione del diametro delle arterie, aumento del numero di cellule del tessuto connettivo e deposizione di calcio, lipofuscina, e degenerazione amiloide. Con l'età, inoltre, il flusso sanguigno nei reni può diminuire addirittura del 50% e nel cervello del 15-20%.

Nel sistema respiratorio, invece, si assiste ad una diminuzione della dimensione della trachea e dei bronchi, quindi ad una riduzione della capacità respiratoria massima. L'elasticità polmonare e il numero di bronchioli e alveoli sono compromessi, il che porta a debolezza muscolare e alterazione funzionale delle ciglia respiratorie, che causa un'autopulizia disregolata dell'albero bronchiale.

Anche il sistema digerente viene intaccato, tramite recessione gengivale, denti mancanti, e diminuzione della secrezione salivare e del muco, per cui viene ridotta la motilità gastrointestinale e lo svuotamento gastrico. Nello stomaco, la secrezione di acido gastrico diviene limitata, e vengono compromesse anche le funzioni endocrina del pancreas e rigenerativa del fegato.

Nel sistema uro-genitale, il rene diminuisce di dimensione e peso, con una conseguente riduzione del flusso sanguigno renale e della filtrazione glomerulare; ancora, si riscontra una minima capacità della vescica e della forza dello sfintere detrusore.

Il sistema muscolo-scheletrico vede la diminuzione della densità ossea, il che porta a degenerazione delle articolazioni e della mobilità, con conseguente perdita di massa e forza muscolare.

Ovviamente, entra in gioco anche il sistema nervoso, con una riduzione del peso del cervello, atrofia della sostanza bianca, solchi approfonditi e allargamento dei ventricoli laterali. Si possono formare anche placche di amiloide e lipofuscina che si accumulano nel citoplasma delle cellule, provocando disturbi legati alla neurotrasmissione del segnale. Vi è, conseguentemente, anche un indebolimento di riflessi e tono muscolare.

Infine, anche gli organi di senso subiscono dei cambiamenti: compromissione della vista (presbiopia), dell'udito (presbiacusia), dell'olfatto e del gusto<sup>1</sup>.

## **2.2 Biologia molecolare dell'invecchiamento**

L'invecchiamento è caratterizzato da segni o marcatori molecolari distintivi, accomunati dalla capacità di soddisfare tre premesse:

- a. La loro manifestazione è associata all'età;
- b. L'accelerazione dell'invecchiamento è mediata dalla accentuazione sperimentale di tali segni;
- c. Esiste l'opportunità terapeutica di decelerare, arrestare o addirittura invertire l'invecchiamento mediante interventi terapeutici sugli stessi biomarker<sup>2</sup>.

Sono stati quindi identificati alcuni segni distintivi dell'invecchiamento:

- Instabilità genomica: consiste nell'instaurarsi di alterazioni nei processi di riparazione al danno del DNA nucleare e mitocondriale; l'accumulo di questi danni può accelerare il processo di invecchiamento cellulare, quindi tissutale.
- Logoramento dei telomeri: è un procedimento che avviene con la replicazione del DNA lineare in assenza della telomerasi (essenziale in quanto la sola DNA polimerasi non riesce a replicare interamente i telomeri), la quale sarebbe in grado di

proteggere i telomeri dal loro stesso accorciamento; alcune regioni del DNA codificante, di conseguenza, possono essere intaccate.

La carenza di telomerasi nell'uomo è associata allo sviluppo prematuro di malattie, come la fibrosi polmonare, la discheratosi congenita e l'anemia aplastica, che comportano la perdita di attività rigenerativa dei tessuti.

- Alterazioni epigenetiche in siti chiave per il controllo del metabolismo: la metilazione, ad esempio, di regioni nucleotidiche implicate in alcuni pathways metabolici, può causare un compattamento cromatinico e, di conseguenza, un'interruzione dell'attività codificante di quella regione.
- Perdita di proteostasi: la proteostasi permette l'equilibrio proteico ed è quindi in grado di difendere gli organismi dalla presenza di proteine disfunzionali, danneggiando queste ultime tramite i due sistemi principali di proteolisi, ovvero il sistema autofagia-lisosomiale e il sistema ubiquitina-proteasoma; essi, diminuiscono con l'invecchiamento.

Un meccanismo di difesa cellulare disregolato provoca l'accumulo di proteine disfunzionali, le quali a loro volta inducono cambiamenti nei processi di ossidazione, glicazione o ubiquitinizzazione, portando alla formazione di aggregati come corpi di inclusione intracellulari o placche amiloidi extracellulari. Questi aggregati possono causare diverse patologie legate all'età, come la sclerosi laterale amiotrofica (SLA), il morbo di Alzheimer, il morbo di Parkinson e la cataratta.

- Riduzione dell'attività di macroautofagia: le cellule senescenti e non funzionali necessitano di essere disgregate, tramite macroautofagia, in modo da recuperarne i tasselli fondamentali e sintetizzarne di nuove. Un'alterazione di questo processo permette l'accumulo di cellule disfunzionali implicate nell'invecchiamento.

- Rilevamento dei nutrienti deregolamentato: l'asse somatotrofico nei mammiferi comprende l'ormone della crescita GH, prodotto dall'ipofisi anteriore, e il suo mediatore secondario, il fattore di crescita simile all'insulina IGF-1. La via di segnalazione intracellulare dell'IGF-1 è la stessa indotta dall'insulina, la quale informa le cellule della presenza di glucosio: per questo motivo, IGF-1 e insulina sono noti come "segnalazione dell'insulina e dell'IGF-1 (IIS)". Si è dimostrato come IIS sia la via di controllo dell'invecchiamento più conservata nell'evoluzione: polimorfismi genetici o mutazioni che riducono le funzioni di GH, IGF-1 o del recettore dell'insulina, sono stati correlati con l'aumento della durata di vita.

- Disfunzione mitocondriale: la funzione mitocondriale, con l'invecchiamento, si deteriora a causa di svariati meccanismi molecolari, tra cui l'accumulo di mutazioni del mtDNA, la proteostasi ridotta che porta all'alterazione strutturale e funzionale dei complessi della catena respiratoria, e il carente turnover dell'organello. Tutto ciò compromette il contributo dei mitocondri alla bioenergetica cellulare (ATP), aumenta la produzione di intermedi reagenti dell'ossigeno (ROS), e quindi può provocare permeabilizzazione delle membrane mitocondriali, con conseguente stato infiammatorio e morte cellulare.

Il deterioramento dell'attività mitocondriale, in quanto essenziale per la vitalità e funzionalità cellulare, partecipa quindi al fenotipo dell'invecchiamento.

- Senescenza cellulare: la senescenza cellulare, arresto stabile del ciclo cellulare, è una risposta indotta da danno acuto o cronico; le cellule senescenti si accumulano in più tessuti e a ritmi diversi, da 2 a 20 volte confrontando giovani (< 35 anni) e anziani (> 65 anni) sani. Il processo interessa principalmente fibroblasti, cellule endoteliali e cellule immunitarie.

La prova che valida il ruolo prominente delle cellule senescenti nell'invecchiamento si basa sul fatto che la loro eliminazione prolunga la durata di salute e la longevità dei topi naturalmente invecchiati. L'eliminazione genetica o farmacologica di cellule senescenti è quindi considerata una terapia anche in molte altre malattie studiate nei topi.

- Esaurimento di cellule staminali: le cellule staminali sono cellule pluripotenti in grado contemporaneamente di proliferare e di differenziarsi in qualunque tipo cellulare; per questo motivo, esse sono implicate nel rimpiazzo delle cellule vecchie nei tessuti. Nel momento in cui la riserva tissutale di queste cellule si riduce al di sotto di un livello soglia, le capacità rigenerative di quel tessuto diminuiscono, portando all'accelerazione del processo di invecchiamento.
- Comunicazione intercellulare alterata: oltre alle alterazioni propriamente cellulari, l'invecchiamento comporta anche cambiamenti a livello di comunicazione intercellulare, che viene quindi deregolata.
- Infiammazione cronica (inflammaging incontrollato): l'infiammazione cronica è indotta da stress ossidativo, danni proinfiammatori, inefficacia del sistema immunitario, senescenza cellulare, e così via; l'instaurarsi di questa condizione aumenta anche l'avvenimento di fenomeni biochimici come la glicazione e l'ossidazione, che a loro volta corrodono la composizione tissutale.
- Disbiosi persistente: un microbiota intestinale in salute è direttamente correlato ad un invecchiamento sano e fisiologico, grazie alle sue capacità di regolazione dell'asse intestino-cervello-sistema immunitario. Il microbiota, tuttavia, può venire alterato da diversi fattori, quali la regione geografica, la variabilità interindividuale, e altri fattori genetici e ambientali, provocando così una discontinuità della barriera microbica e un aumento del rischio di infezioni<sup>3</sup>.

### 2.3 Gli RNA non codificanti: ncRNAs e miRNAs

I non-coding RNAs costituiscono una classe di RNA che non codifica per alcuna proteina (ncRNAs), in gran parte generata dalla fonte intronica prodotta in parallelo alla trascrizione delle sequenze codificanti; ciò, tuttavia, non implica necessariamente che non contengano informazione, e quindi funzione.

Si è infatti scoperto che la maggior parte dei genomi dei mammiferi e di altri organismi complessi viene trascritto in ncRNA: negli organismi multicellulari, la proporzione di sequenze codificanti diminuisce con l'aumentare della complessità, con un concomitante aumento della quantità di sequenze non codificanti; ciò, soppianta la teoria genetica proteina-centrica secondo cui l'RNA funziona principalmente come intermedio informativo tra una sequenza codificante di DNA (il gene) e la sua proteina codificata, e permette di superare l'ipotesi che l'RNA non codificante costituisca semplicemente un accumulo di detriti evolutivi. Infatti, soprattutto negli organismi eucariotici complessi, lo sviluppato sistema di segnalazione dell'RNA sembra essere correlato a traiettorie più sofisticate di regolazione genetica, silenziamento trascrizionale e post-trascrizionale, modifica della cromatina, e altri fenomeni.

I ncRNAs includono microRNAs e snoRNAs (small nucleolar RNA) e ulteriori classi di piccoli RNA regolatori, alcuni ancora da indagare dettagliatamente, che sembrano essere coinvolti nella regolazione dell'espressione genetica nella fisiologia e nello sviluppo, come il compattamento cromatinico, la memoria epigenetica, la trascrizione, lo splicing, l'editing dell'RNA, la traduzione e il turnover.

Interessante è che ncRNAs, identificati in batteri e archea, hanno omologhi di Argonaute, famiglia di endonucleasi che legano l'RNA le quali sono fondamentali nell'attività dei microRNAs (miRNAs) e siRNAs (short interfering RNA) negli eucarioti.

Gli RNA regolatori funzionano, nella maggior parte dei casi, mediante accoppiamento di basi complementari ad altri RNA/DNA, costituendo complessi RNA:RNA (RNA:DNA) su cui può agire un'infrastruttura generica (nel caso dell'interazione miRNA-mRNA, agisce il complesso RISC).

Le regioni UTR (poste al 5' e 3' degli mRNA, sono Untranslated region, regioni che non vengono tradotte) degli mRNAs, in particolare, possono costituire il *target* biologico di ncRNAs come i miRNAs. È da notare, infatti, che all'aumentare della complessità dell'organismo aumenta la lunghezza degli UTR, segnalando la regolazione sofisticata dell'mRNA<sup>4</sup>.

### 2.3.1 I microRNAs (miRNAs)

I microRNAs sono piccole molecole endogene di RNA non codificante, con lunghezza media di 22 nt (19-25 nt), coinvolte nella regolazione dell'espressione genica post-trascrizionale dei geni bersaglio.

Essi derivano da lunghi trascritti (miRNA primari): nel nucleo, una RNAsi di tipo III (Drosha) riconosce strutture a forcina sui miRNA primari convertendoli a precursori; in seguito, l'esportina-5 trasporta i precursori nel citoplasma, in cui maturano tramite l'azione di un'ulteriore RNAsi di tipo III (Dicer). La forma matura viene infine legata da proteine argonaute con le quali costituisce il complesso RISC (RNA-induced silencing complex) con attività endonucleasica. Il silenziamento genico, infatti, può essere indotto dalla repressione della traduzione o direttamente dalla degradazione del bersaglio tramite quest'ultimo complesso.

Un singolo miRNA può *targettare* centinaia di mRNAs e influenzare un intero percorso di interazione funzionale.

La loro individuazione, condotta dagli studiosi Ambros e Ruvkun nel 1993, prese piede tramite lo studio del nematode *Caenorhabditis elegans*: si individuò il microRNA lin-4 come regolatore dell'mRNA

del gene *lin-14*: in particolare, isolando il gene *lin-4*, si accorsero che non produceva mRNA, bensì piccoli filamenti di RNA lunghi 22 nt e parzialmente omologhi alla regione 3'UTR del gene *lin-14*.

La scoperta dei microRNAs rivoluzionò la biologia molecolare, in quanto sono in grado di reprimere l'espressione di determinati geni sfruttando la totale o parziale complementarità con altri RNA. Se si verifica l'inattivazione di un miRNA, infatti, si segnala la sovraespressione del rispettivo mRNA bersaglio; viceversa, l'attivazione di un miRNA porta alla down-regolazione del *target* nei processi cellulari.

Per questo motivo, la degradazione anomala dei microRNAs può essere implicata nell'invecchiamento e nell'insorgenza di svariate patologie, permettendo di identificarli come nuova classe di *targets* terapeutici.

Si può dedurre, infine, che probabilmente si è fraintesa la natura della programmazione genetica negli organismi superiori, la quale viene invece ampiamente regolata anche da un repertorio di ncRNAs, la cui funzione è tutt'ora parzialmente sconosciuta.

L'esistenza di un sistema di regolazione raffinato e complesso si configura nell'ampia varietà di caratteristiche osservate tra i mammiferi e altri organismi complessi, nonostante la relativa somiglianza dei proteomi.

La genomica funzionale dei ncRNAs e delle rispettive mutazioni risulterà come un compito più complesso rispetto a quello affrontato con lo studio funzionale dei ruoli biologici delle proteine e delle rispettive isoforme; tuttavia, tramite il ruolo centrale della bioinformatica, sarà essenziale per poter sfruttare l'omologia di sequenza per identificare i ncRNAs, nonché per sviluppare approcci terapeutici che modulino l'RNA regolatorio e/o il suo bersaglio<sup>5</sup>.

## **2.4 Gli RNA non codificanti nell'invecchiamento**

Gli RNA non codificanti (ncRNAs) sono stati identificati come potenti regolatori della funzione cellulare e tissutale, in grado quindi di modificarla e anche ridurla, come nel caso dell'invecchiamento; sono infatti considerati marcatori diagnostici e predittivi, e quindi bersagli farmacologici non solo del fenomeno dell'invecchiamento, ma anche di diverse malattie correlate e non correlate.

Le malattie legate all'età riguardano tutti gli organi dell'organismo umano, uno dei quali, il più vasto, è la pelle: si evidenzia l'importante ruolo dei miRNAs e dei loro bersagli sull'invecchiamento della pelle, in particolare dei cheratinociti, e la disregolazione della proliferazione cellulare e della senescenza replicativa.

L'invecchiamento è anche fortemente correlato alle alterazioni metaboliche e alla degenerazione muscolare, traiettorie già consolidate come bersagli dei miRNAs.

Inoltre, molti miRNAs sono arricchiti nel sistema nervoso centrale, compreso il liquido cerebrospinale, regolando in questo modo importanti funzioni neurologiche che possono portare a patologie come l'Alzheimer.

I miRNAs possono anche lasciare la cellula, tramite carrier come le vescicole extracellulari, ed essere rilevabili nello spazio extracellulare e nella circolazione sanguigna, suggerendo che la loro stessa circolazione produca effetti sistemici di invecchiamento<sup>4</sup>.

## **2.5 La comunicazione tra tessuti**

Le vescicole extracellulari (EVs), catalogate in base a dimensione e biogenesi in esosomi, microvescicole (MVs) e corpi apoptotici, sono piccole strutture vescicolari di membrana che vengono rilasciate durante l'attivazione cellulare, la senescenza o la morte cellulare programmata (apoptosi, ma anche necroptosi e piroptosi).

Le EVs fungono da mediatrici per le comunicazioni cellula-cellula a lunga distanza, e possono quindi trasferire molecole bioattive, come citochine incapsulate e informazioni genetiche, dalle loro cellule

parentali alle cellule bersaglio, modulandone di conseguenza il comportamento.

Nell'obesità, ad esempio, le EVs rilasciate dal tessuto adiposo bruno (BAT) possono controllare il rimodellamento del tessuto adiposo bianco verso l'imbrunimento, e il mantenimento dell'omeostasi metabolica.

È interessante sottolineare che le vescicole possono anche fungere da mediatrici della disfunzione metabolica, in quanto sono state identificate come modulatrici in vari disturbi metabolici, come la resistenza all'insulina, il diabete mellito, e la steatosi epatica non alcolica.

Il tessuto adiposo (AT), inizialmente considerato come un tessuto immagazzinatore di nutrienti in eccesso, è stato così ri-definito come organo endocrino, che secreta varie adipochine (fattori solubili) e anche EVs le quali possono regolare la funzione di altri organi metabolici.

Le EVs, strutture subcellulari membranose con doppi strati lipidici e componenti citoplasmatici, vengono rilasciate dalle cellule parentali secondo un sistema estremamente definito e regolato: i carichi bioattivi che trasportano includono proteine, lipidi, complessi multimolecolari e acidi nucleici (DNA, RNA, microRNA, siRNA e lncRNA), molti dei quali possono modulare l'espressione genica e le vie di segnalazione nelle cellule bersaglio.

In risposta ai vari stimoli, le EVs potrebbero essere rilasciate da tipologie diverse di cellule e secernere categorie diverse di fattori. Esse forniscono una via alternativa di comunicazione paracrina ed endocrina, compreso il contatto diretto cellula-cellula o il riconoscimento mediato dai recettori di ormoni solubili e citochine.

Molecole specifiche che si trovano sulla superficie delle EVs possono, infatti, rappresentare un "codice a barre" riconosciuto da recettori specifici posti sulle membrane delle cellule bersaglio: ciò permette che le EVs agiscano in modo specifico sui propri *targets*.

È stato, quindi, proposto che le EVs circolanti siano nuovi biomarcatori diagnostici e prognostici nelle malattie metaboliche. Agendo come mediatori e biomarcatori tra organi, esse diventano cruciali nella regolazione delle funzioni biologiche dell'organismo e della sua omeostasi.

La mancanza di marcatori EV-specifici e sistemi di isolamento adeguati rappresentano, tuttavia, una sfida per la ricerca.

La ricerca clinica e le applicazioni delle EVs, in conclusione, nonostante siano ancora in fase di sviluppo, si prevede che forniranno potenti strumenti diagnostici e terapeutici<sup>6</sup>.

### **3. MATERIALI, METODI E RISULTATI**

#### **3.1 Sequenziamento bulk dell'RNA e proteomica dei campioni della coorte *TMS***

L'alterata comunicazione intercellulare, la perdita di proteostasi e l'erosione della funzione mitocondriale sono processi deleteri implicati nelle traiettorie molecolari che regolano l'invecchiamento dell'intero organismo.

Si è eseguito il sequenziamento di RNA bulk in 16 organi e la proteomica del plasma a 10 età nel corso della vita del topo, e i dati sono stati integrati con quelli della *Tabula Muris Senis*: sono state individuate variazioni di espressione lineari e non lineari che possono essere catalogate sulla base di comuni funzioni biologiche, tra cui la regolazione della matrice extracellulare, il legame proteico, la funzione mitocondriale e la risposta infiammatoria e immunitaria.

I geni in questione sono espressi sorprendentemente in modo simile nei vari tessuti, differendo per l'età di esordio e l'ampiezza: l'attivazione diffusa delle cellule T e B, ad esempio, viene rilevata per la prima volta nei depositi adiposi bruni (BAT) nel periodo di mezza età. Il sequenziamento dell'RNA a singola cellula, successivamente, conferma l'accumulo di cellule adipose T e B, insieme alle plasmacellule, nei diversi organi.

Tramite il sequenziamento dell'RNA, e l'individuazione dei cambiamenti di espressione, si può notare come essi siano correlati con i corrispondenti livelli proteici nel plasma, attribuendo un ruolo prominente nell'invecchiamento asincrono intra- e inter-organo anche ai fattori circolanti.

Come accennato precedentemente, per conoscere e monitorare le traiettorie molecolari globali dell'invecchiamento, si sono misurate le proteine plasmatiche e sequenziato l'RNA da 16 organi diversi, da topi maschi (età compresa tra 1 e 27 mesi) e femmine (età compresa tra 1 e 21 mesi) del tipo C57BL/6JN.

I topi, spediti dalla colonia del National Institute on Aging a Charles Rivers all'Unità medica veterinaria (VMU), sono stati sottoposti ad un ciclo di luce/buio di 12 ore con cibo e acqua *ad libitum*.

Successivamente, è stata eseguita l'anestesia con Avertin al 2,5% v/v, i topi sono stati pesati, rasati e il sangue è stato prelevato tramite punctura cardiaca; gli organi interi, in seguito, sono stati sezionati nel seguente ordine: pancreas, milza, cervello, cuore, polmone, rene, tessuto adiposo mesenterico (MAT), intestino (duodeno), tessuto adiposo gonadico (GAT, deposito inguinale), muscolo (tibiale anteriore), pelle (dorsale), tessuto adiposo sottocutaneo (SCAT, deposito posteriore), tessuto adiposo bruno (BAT, deposito interscapolare) ossa (femore e tibia) e midollo osseo.

I topi sono stati scelti tramite randomizzazione e gli organi sono stati posti immediatamente in ghiaccio secco.

L'RNA è stato isolato, per quanto riguarda ossa e pelle, tramite frantumazione su azoto liquido con mortaio e pestello, mentre gli altri organi sono stati omogeneizzati TissueRuptur in tubi conici da 50 ml. In entrambi i casi l'RNA è stato estratto utilizzando TRIzol.

I detriti cellulari ottenuti dall'omogenizzazione tissutale sono stati pellettati in provette da 1,5 ml a 12.000 x g per 5 minuti a 4°C: il surnatante ottenuto, contenente gli acidi nucleici, è stato trasferito in

una nuova provetta da 1,5 ml a cui si è aggiunto il cloroformio, per la separazione in fasi.

Dopo agitazione tramite vortex alla massima velocità per 10 secondi, i campioni sono stati nuovamente trasferiti in provette di gel Phase Lock da 1,5 ml e poi centrifugati a 12.000 x g per 5 minuti a 4°C.

La fase acquosa che si ottiene viene trasferita in una nuova provetta e l'RNA purificato mediante colonne RNeasy. L'RNA eluito è stato quantificato mediante nanogoccia e preservato a -80°C.

La sintesi successiva del cDNA a partire dall'RNA isolato si è basata sul protocollo Smart-seq2, mentre la produzione della libreria di cDNA sull'utilizzo di Tn5.

Infine, tramite legame tra gli adattatori posti alle estremità dei frammenti di cDNA e le nanoballs con sequenze complementari posizionate su piastre, si è eseguito il sequenziamento tramite Illumina e Cyclic Reversible Terminators (CRTs).

Calcolando il profilo di espressione medio per ciascun gene in tutti 16 gli organi si rileva un arricchimento funzionale per i segni distintivi dell'invecchiamento, quali ad esempio elevata infiammazione, disfunzione mitocondriale e perdita di proteostasi (Fig. 1).

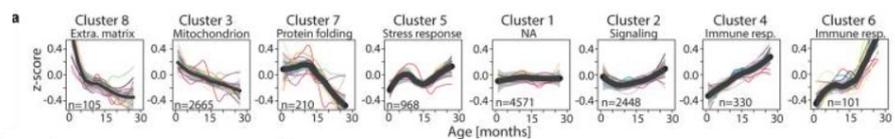


Figura 1: raggruppamento dell'espressione genica in 8 cluster. Ciascun gruppo di geni descrive geni che sono coinvolti nella sintesi di proteine della matrice extracellulare, dei mitocondri, coinvolte nel folding proteico, nella risposta allo stress, nella trasmissione di segnale e risposta immunitaria.

Il cluster 3, ad esempio, diminuisce linearmente nel corso della vita ed è fortemente arricchito di geni mitocondriali.

Il cluster 7, invece, diminuisce drasticamente dopo circa 13 mesi di età dei topi e descrive geni che sintetizzano per proteine coinvolte nella risposta da shock termico importati per il ripiegamento delle proteine (*folding*).

Il cluster 8, ancora, mostra un declino iniziale importante e poi graduale, e descrive geni coinvolti nella sintesi di proteine della matrice extracellulare, mentre il cluster 4, costituito da beta-2 microglobulina e immunoglobulina *Igj*, e il 6, costituito dai geni *Cd74* e *Clq* del complemento, vedono un aumento costante per tutta la vita.

Si è successivamente eseguito il sequenziamento a singola cellula dell'RNA (*FACS scRNA-seq*) per confermare l'infiltrazione di cellule B nel plasma: il procedimento è innanzitutto utile per esaminare se i cambiamenti di espressione dell'RNA osservati sono intrinseci alle cellule durante l'invecchiamento o derivano da cambiamenti nella composizione cellulare.

Utilizzando, quindi, la metodica del *scRNA-seq*, si è valutato se ogni gene correlato all'età, individuato dall'*RNA-seq bulk*, fosse specifico per un singolo tipo cellulare, o ampiamente espresso in più tipi.

Nel rene, ad esempio, le aconitasi *Aco1* e *Aco2* e la citrato sintasi (*Cs*) sono correlate negativamente con l'età ed espresse in tutti i tipi cellulari, identificando un declino funzionale mitocondriale in tutto l'organo. Altri geni, invece, come *Ms4a7*, sono correlati positivamente con l'età ma espressi unicamente nei macrofagi renali. Tramite poi un'ulteriore analisi con un software di deconvoluzione come FACS-Smart-seq2 e dati *scRNA-seq* di microfluidic-droplet, si è stimata l'abbondanza del tipo di cellula che cambia con l'età in ciascun tessuto: si è rilevato un ampio aumento del numero di cellule B nel fegato e nel GAT con l'età, confermando che l'accumulo di cellule immunitarie è segnale infiammatorio dell'intero organo.

Allo stesso modo, si è eseguita l'analisi proteomica per valutare l'alterazione dei fattori circolanti che mediano la comunicazione intercellulare e tra organi: con esperimenti di parabiosi eterocronica, si sono identificate proteine plasmatiche con funzioni dannose o ringiovanenti nell'invecchiamento del cervello, dei muscoli, del pancreas, delle ossa e di altri organi.

Si sono individuate 25 proteine plasmatiche correlate positivamente con l'espressione genica in almeno un organo, e 25 coppie uniche proteina-organo. Interessanti sono *Vcam1* e *Postn*: il primo media l'invecchiamento cerebrale da parte del plasma vecchio, mentre la perdita di *Postn* contribuisce al metabolismo lipidico compromesso nei tessuti adiposi<sup>7</sup>.

### 3.2 Analisi dei campioni della coorte TMS

In questo studio si sono sequenziati 771 campioni di tessuto derivanti dalla coorte di topi invecchiati sani TMS, *Tabula Muris Senis*, in modo da poter mappare i cambiamenti molecolari dell'intero organismo durante l'invecchiamento sano. In particolare, come descritto precedentemente, si sono mappati tessuti provenienti da 16 organi diversi in dieci punti temporali distinti, da 1 a 27 mesi (Fig. 2).

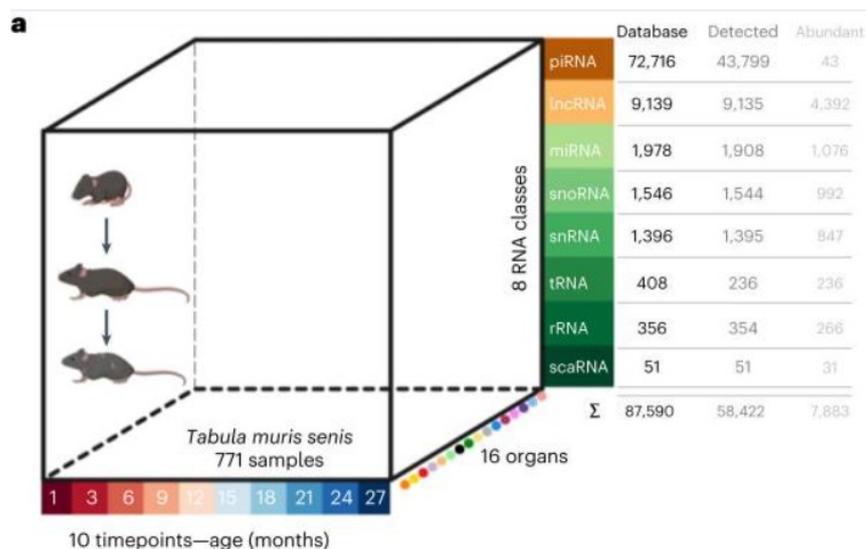


Figura 2: dati della coorte di invecchiamento TMS costituita da campioni di topo raccolti da 16 diversi tessuti in dieci differenti punti temporali, in ognuno dei quali sono state analizzate massimo sei repliche. In totale, sono state mappate 87.590 sequenze di riferimento di RNA provenienti da otto classi di RNA, di cui 58.422 ncRNAs annotati nelle letture grezze e 7.883 espressi in abbondanza nella coorte TMS.

Nonostante il protocollo si arricchisca maggiormente di piccoli ncRNAs, in particolare miRNAs maturi, il sequenziamento della *TMS* si estende anche a piRNA, lncRNA, snoRNA, snRNA, tRNA, rRNA e scaRNA.

La raccolta di campioni *TMS* deriva da 16 tessuti solidi di topi C57BL6/JN, il ceppo puro inbred più utilizzato nella ricerca per l'alto grado di uniformità nelle caratteristiche genetiche ereditarie, e in dettaglio la raccolta comprende: ossa (femore e tibia), cervello (emiencefalo), tessuto adiposo bruno (BAT, deposito interscapolare), tessuto adiposo gonadico (GAT, deposito inguinale), cuore, rene, muscolo degli arti (tibiale inferiore), fegato, polmone, midollo osseo, tessuto adiposo mesenterico (MAT), pancreas, pelle, intestino tenue (duodeno), milza e tessuto adiposo sottocutaneo (SCAT, deposito posteriore).

Le letture risultanti dal mappaggio sono state confrontate con 87.590 sequenze di ncRNAs note da database di riferimento consolidati, come miRBase 22: si sono rilevati 58.422 diversi ncRNAs, nei quali i miRNAs costituiscono la classe più abbondante (36,2 % delle letture. Fig.3).

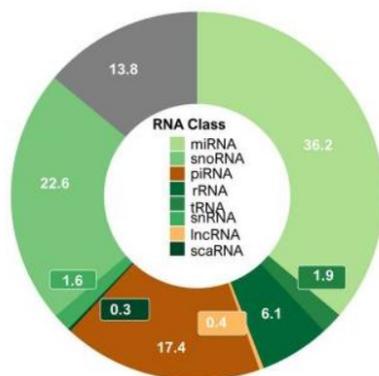


Figura 3: percentuali delle sequenze mappate per tutte le classi di RNA dei campioni della coorte *TMS*.

Si segnala, tuttavia, che le letture delle varie classi di RNA variano sostanzialmente tra i tessuti, suggerendo che la maggior parte delle traiettorie molecolari regolatrici sia tessuto-specifica (Fig.4).

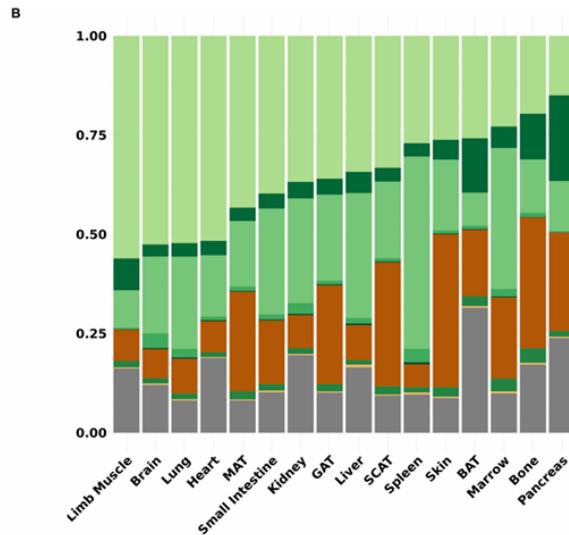


Figura 4: distribuzione delle sequenze delle classi di RNA mappate in percentuale e per ciascun tessuto, suddivisi in base alla quota discendente di miRNAs.

Ci si è posti il problema di comprendere se la variazione della distribuzione delle letture fosse dovuta alla lunghezza delle sequenze di riferimento: si è allora studiata la percentuale della lunghezza della sequenza coperta dalla lettura rispetto alla lunghezza di riferimento, recuperando in parte o completamente la sequenza completa (Fig.5).

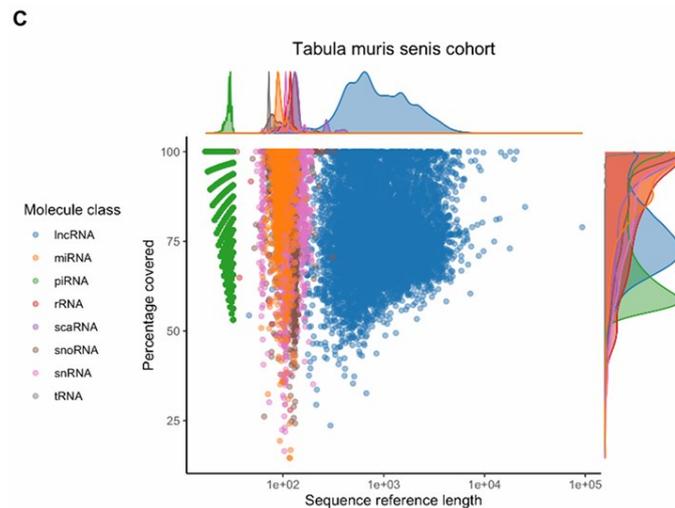


Figura 5: percentuali della copertura delle sequenze mappate rispetto a quelle di riferimento, colorate in base alle classi di ncRNAs rilevate nella coorte *TMS*. Si nota come non tutti i microRNAs vengano coperti dalla lettura, data la difficoltà di sequenziamento per ncRNAs; altri, invece, come i piRNAs, hanno una percentuale di copertura che non va al di sotto del 50%, indicando che siano ampiamente coperti.

Si è successivamente calcolato il massimo assemblaggio di contig per ciascun RNA sequenziato, ovvero la lettura contigua più lunga mappata, confrontata sempre con la lunghezza di riferimento della sequenza nota (Fig. 6).

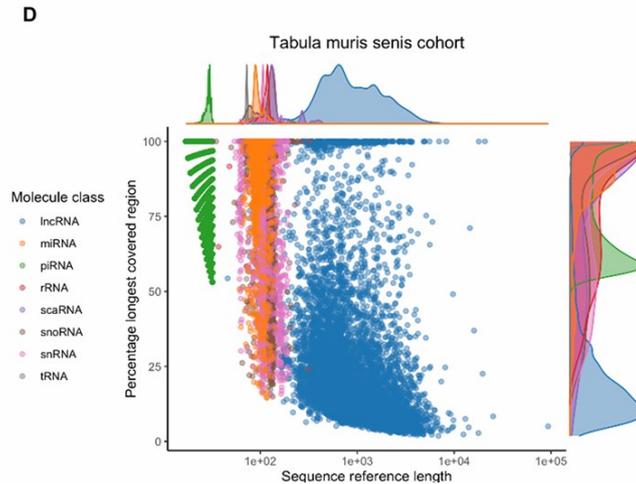


Figura 6: percentuali delle regioni più lunghe coperte dalla lettura, rispetto a quelle di riferimento *TMS*.

Nonostante la frazione della sequenza coperta da assemblaggio massimo diminuisca all'aumentare della lunghezza degli RNAs (correlazione inversa: Spearman's  $\rho = -0.43$ ), si è verificato come si riuscisse in ogni caso a generare, per tutte le classi di RNA, un sottoinsieme di lettura fino al 100% dell'intera lunghezza.

Si sono mantenute solo i fattori ad alta abbondanza in ogni classe di ncRNA, ovvero quelli con almeno 1 lettura mappata per milione (1 rpmm), assemblando infine il dataset abbondante.

I ncRNAs sono stati successivamente raggruppati sulla base dell'espressione tessuto-specifica, tramite l'incorporamento stocastico di vicinanza distribuita (t-SNE): un cluster di tessuti, ad esempio, contiene pelle, GAT e SCAT, per la correlazione biologica e funzionale (Fig. 7).

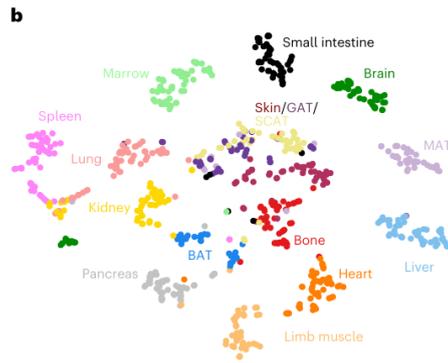


Figura 7: visualizzazione t-SNE di tutti i campioni della coorte *TMS* e dei rispettivi ncRNAs, colorati per origine tissutale.

Si è analizzato se l'identità del tessuto, insieme ad altri aspetti tecnici o biologici, quali ad esempio il sesso, fossero rilevanti nella variazione di espressione dei ncRNAs: mentre il t-SNE per il sesso degli animali segue una distribuzione uniforme, escludendolo quindi come fattore implicato, la tipologia di tessuto gioca un ruolo prominente nella variazione di distribuzione (Fig. 8).

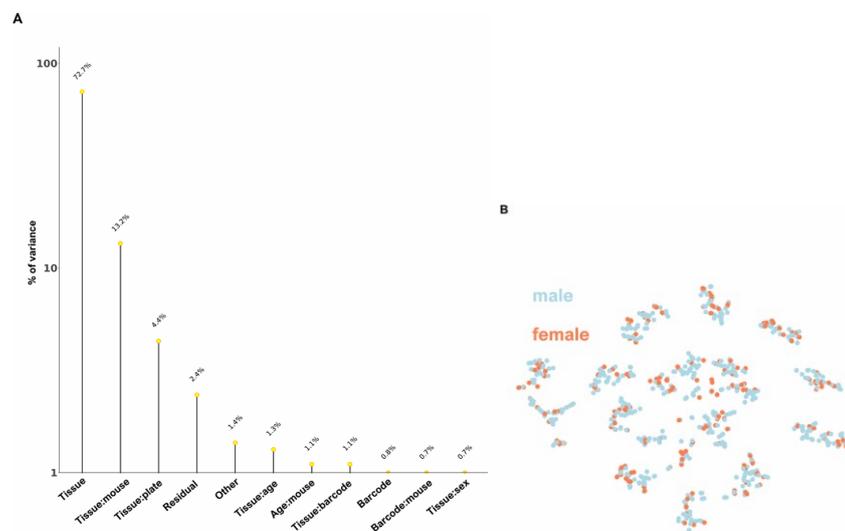


Figura 8: componenti biologici principali per l'analisi della varianza di distribuzione (sesso, età, tessuto, topo).

Si è successivamente applicato un filtro organo-specifico per valutare se l'espressione dei ncRNAs variasse non solo tessuto-specificamente, ma anche con l'età (Fig. 9).

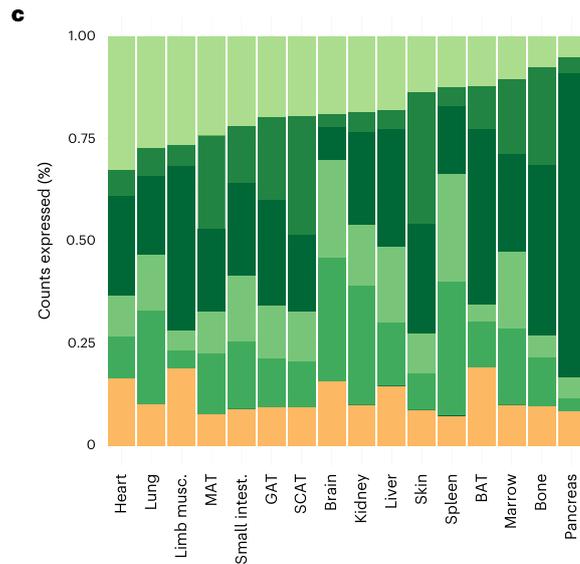


Figura 9: percentuali di conteggi per classe di RNA, calcolate dopo filtraggio locale per tutti i tessuti della coorte *TMS*, suddivise per colori di classe RNA. Per la corrispondenza delle classi vedi figura 2.

Analizzando l'espressione degli ncRNAs nel tempo, si sono identificati due cluster tissutali (Fig. 10).

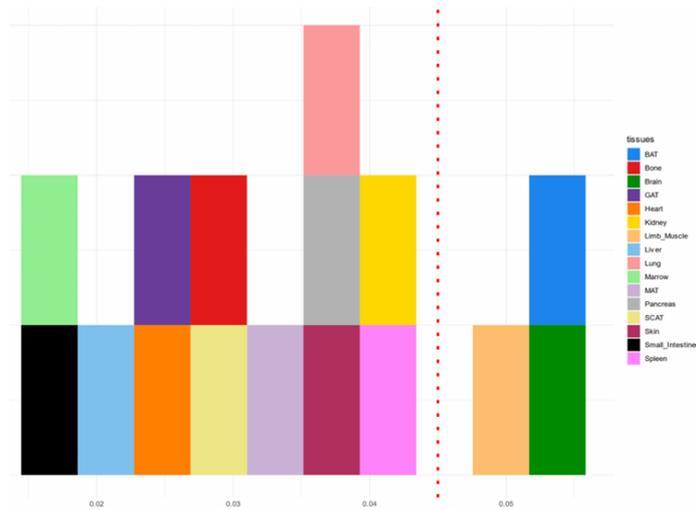


Figura 10: istogramma della varianza media calcolata, dopo filtraggio locale, in percentuali di conteggio di tutte le classi di RNA. La soglia è fissata al 4,5%, per suddividere tra tessuti altamente variabili e tessuti stabili.

Un cluster mostrava una distribuzione di conteggio stabile, mentre l'altro una varianza. In particolare, 3 dei 16 tessuti analizzati mostravano una varianza elevata (cervello, BAT e muscolo degli arti) (Fig. 11).

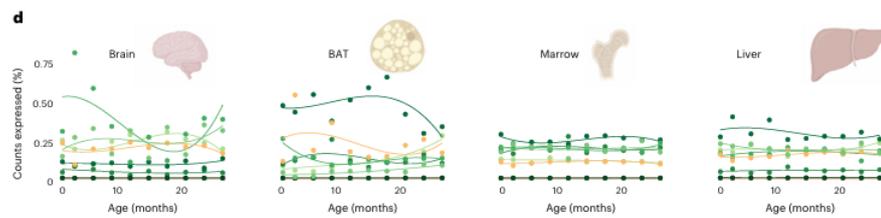


Figura 11: variazione della distribuzione del conteggio per classe di ncRNA, durante il ciclo di vita del topo, nel cervello, BAT, midollo e fegato, calcolata dopo filtraggio locale.

Nel cervello, la quota di letture di snRNA è diminuita dal 77,9% al 10,0% con un concomitante aumento di miRNAs da 9,1% a 28,5%. Nel BAT, allo stesso modo, la quota di miRNAs è aumentata dal 4,1% al 26,4%, associata ad una diminuzione dell'espressione degli rRNA da 62,7% a 27,8%.

Si è inoltre notato che i miRNAs mostravano le correlazioni più forti con l'età in tutti i tessuti (Fig. 12)<sup>7</sup>.

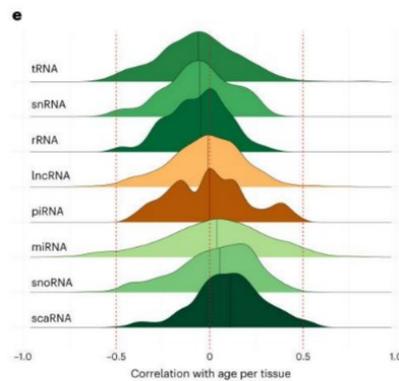


Figura 12: densità della correlazione del rango di Spearman di tutti i ncRNAs espressi in correlazione con l'età e con ogni tessuto.

### 3.3 sc-RNAseq da campioni di parabiosi eterocronica

La parabiosi eterocronica è un procedimento chirurgico volto a collegare il sistema circolatorio di due animali vivi di età differenti, in modo da valutarne gli effetti benefici del sangue giovane nel topo anziano, e viceversa l'invecchiamento provocato dal sangue anziano nel topo giovane.

La parabiosi tramite il metodo peritoneale è stata ottenuta suturando insieme il peritoneo dei fianchi adiacenti dei due topi, formando

un'unica e continua cavità peritoneale. Inoltre, per promuovere il movimento coordinato, sono state suturate insieme anche le articolazioni adiacenti del ginocchio e del gomito, mentre la pelle è stata unita con autoclip chirurgici.

Tutto ciò permette di identificare i procedimenti molecolari circolanti e comuni che regolano da una parte l'invecchiamento, dall'altra il ringiovanimento.

Si è notato, tuttavia, come il sangue giovane inneschi l'espressione di nuovi set genici, oltre a invertire i modelli di invecchiamento già noti; al contrario, il sangue invecchiato riduce la loro espressione globale. Nonostante si sia intuito che la presenza di fattori circolanti possa mediare i processi di invecchiamento come quelli di ringiovanimento, non sono ancora completamente note le conseguenze della parabiosi su organi e tessuti: di conseguenza, si è deciso di eseguire scRNA-seq basato su Smart-seq2 di topi maschi C57BL6/JN dopo 5 settimane di parabiosi eterocronica, periodo nel quale i due topi avevano rispettivamente raggiunto i 4 e i 19 mesi di età.

Integrando i dati sull'invecchiamento di singola cellula con quelli provenienti dallo stesso studio eseguito per la *Tabula Muris Senis*, si è potuto confrontare il ringiovanimento (REJ) e l'invecchiamento accelerato (ACC), mediati dalla parabiosi, con l'invecchiamento sano (AGE) (Fig. 13).

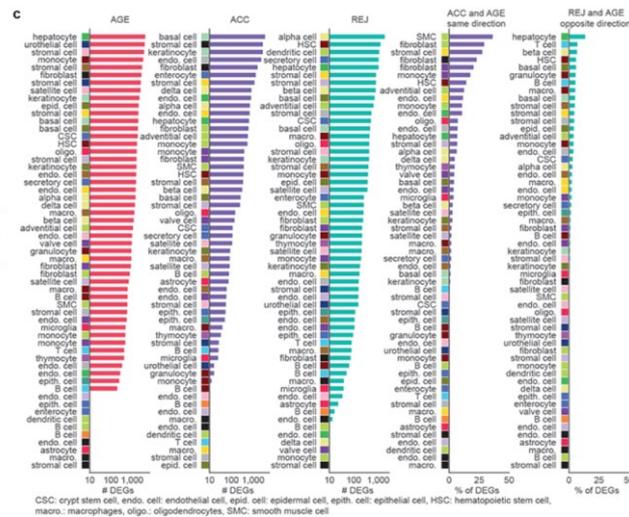


Figura 13: tipologie cellulari classificate in base alla percentuale di DEG, geni differenzialmente espressi.

Per determinare i tipi cellulari suscettibili all'invecchiamento accelerato o al ringiovanimento durante la parabiosi, si è analizzata l'espressione genica differenziale (DEG) in 49 tipi cellulari per ACC (giovani isocronici vs. giovani eterocronici) e 51 tipi cellulari per REJ (invecchiati isocronici vs. invecchiati eterocronici), da un totale di 20 tessuti e 122.280 cellule (Fig. 14).

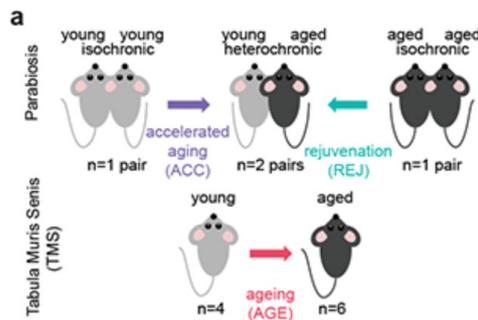


Figura 14: schema sperimentale.

Si sono rilevati DEG in quasi tutti i tipi cellulari, con l'invecchiamento sano (AGE) che esercita il fenotipo più rilevante sia in termini di numero di DEG sia in termini di entità di cambiamento (Fig. 15).

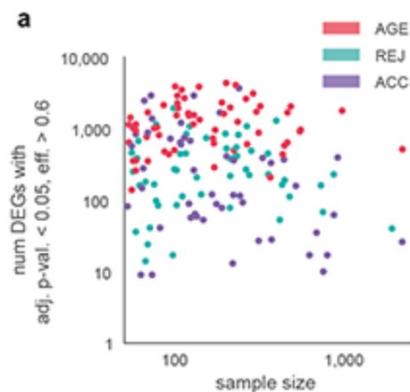


Figura 15: numero di DEG tracciati rispetto al numero totale di cellule all'interno dei gruppi di controllo e di trattamento.

In particolare, gli epatociti mostrano il maggior numero di DEG con il normale invecchiamento e una forte risposta al sangue invecchiato, mentre il sangue giovane provoca un altrettanto elevato aumento dell'espressione genica e la più grande inversione dei cambiamenti

dei geni legati all'età, in qualsiasi tipo di cellula. L'elevata velocità di perfusione del fegato può spiegare perché gli epatociti siano i primi tipi cellulari descritti a subire ringiovanimento durante parabiosi eterocronica.

Per quanto riguarda le cellule immunitarie, il cui accumulo è tappa fondamentale dell'invecchiamento, esse, insieme ai loro precursori, vengono modificate a livello trascrizionale durante la parabiosi, indicando una possibile stretta correlazione tra l'invecchiamento del sistema immunitario e i cambiamenti della composizione del sangue. Inoltre, si è osservato che i DEG dell'invecchiamento, ripristinati dal ringiovanimento, sono altamente arricchiti per i geni della catena di trasporto mitocondriale, aumentando l'espressione di geni come *Cox6c*, *Cox7c*, *Ndufa1*, e *Ndufa3*.

Si sono quindi classificati i geni espressi in modo differenziale in base alla sovrapposizione tra AGE e DEG, e parabiosi (ACC/REJ) e DEG, catalogando come “coerenti” i geni con espressione opposta tra AGE e REJ e i geni con la stessa direzione di espressione tra AGE e ACC, mentre come “incoerenti” i geni con stessa direzione tra AGE e REJ, e geni con direzione opposta tra AGE e ACC.

Si nota che REJ e AGE spesso condividono la stessa direzione del cambiamento dell'espressione genica (“incoerenti”), probabilmente indicando cambiamenti riparativi e compensatori indotti dall'invecchiamento e amplificati dalla parabiosi e dal sangue giovane.

Si può concludere che, mentre gli effetti del sangue invecchiato tendono ad accelerare i normali cambiamenti legati all'invecchiamento sano, il sangue giovane non solo inverte i profili molecolari legati all'età, bensì avvia nuove traiettorie molecolari<sup>8</sup>.

### 3.4 Linee cellulari HEK 293T

Le ACC 63 appartengono alla linea cellulare HEK 293T, la quale deriva da cellule renali umane embrionali (HEK), mentre il suffisso “293T” indica la loro versione modificata. Questa linea cellulare è preferibile per la capacità di crescere in coltura, di trasfezione e di espressione e replicazione di virus ricombinanti.

Per questo esperimento, le HEK 293T sono state acquistate dalla collezione tedesca di microrganismi e colture cellulari (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ), e coltivate con penicillina (100 U/ml), streptomina (100 µg/ml) e 10% (vol/vol) di FCS (siero fetale bovino), e sono state utilizzate per studiare l’interazione di plasmidi di espressione di miR-29 e plasmidi reporter 3’UTR<sup>7</sup>.

### 3.5 Test ad alto rendimento con plasmide di espressione di miR-29 e plasmidi reporter 3’UTR

Il test ad alto rendimento, il quale ha permesso di validare i *targets* molecolari della famiglia dei miR-29, ha utilizzato come ospiti le cellule ACC 63.

Si sono prima ottenuti i costrutti: il plasmide di espressione del miR-29a, pSG5-miR-29a, e il plasmide reporter dei bersagli 3’UTR, pMIR-RNL-TK, previa identificazione dei geni bersaglio previsti per miR-29 che avessero almeno un sito di legame 7mer e la minima distanza di Hamming possibile tra i 3’UTR umani e murini e i siti di legame; dopodiché, essi sono stati clonati all’interno della linea cellulare.

Il plasmide reporter pMIR-COL1A2, identificato come bersaglio diretto di miR-29a-3p, è stato utilizzato come controllo positivo.

In particolare, le cellule HEK 293T sono state seminate a  $3,2 \times 10^4$  cellule per pozzetto in una piastra da 96 pozzetti utilizzando un sistema di manipolazione dei liquidi epMotion 5,075. Ventiquattro ore dopo, sono state trasfettate con 50 ng per pozzetto del plasmide

reporter pMIR-RNL-TK, con o senza inserto (gene *target*), e 200 ng per pozzetto del plasmide di espressione pSG5-miR-29a (o del vettore di espressione vuoto pSG5). Quarantotto ore dopo la trasfezione, le HEK 293T sono state lisate: i lisati sono stati sottoposti a luminometro per micropiastre GloMax Navigator utilizzato substrati per la luciferasi, il quale ha potuto misurare il livello di interazione tra il miRNA-29 e il suo *target*<sup>7,9</sup>.

### 3.6 miRNAs locali e miRNAs globali

Si è osservato che, per i miRNAs espressi in tutti i tessuti, la maggior parte è correlata positivamente con l'età (Fig. 16).

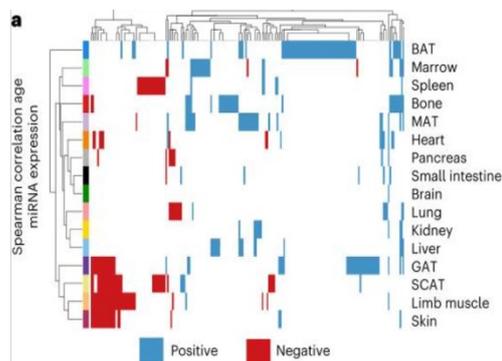


Figura 16: classifica Spearman dei valori di interazione dei miRNAs correlati all'età positivamente in blu ( $r > 0,5$ ), negativamente in rosso ( $r < 0,5$ ), non correlati in bianco ( $-0,5 < r < 0,5$ ).

In più, si sono individuati anche molti insiemi di miRNAs correlati con l'età in un tessuto specifico. Per citare degli esempi, 6 miRNAs sono correlati negativamente esclusivamente nel muscolo degli arti, e 37 sono correlati positivamente solo nel BAT; in particolare, uno di questi 37 miRNAs, il miR-107, regola la sensibilità all'insulina ed è ipotizzato come *target* per il trattamento del diabete di tipo 2 e dell'obesità: il suo aumento nell'invecchiamento, infatti, potrebbe spiegare il fatto che l'età sia un fattore di rischio per il diabete.

Si nota, ancora, che molti altri miRNAs sono correlati linearmente con l'età (Fig. 17) e in più di un tessuto: miR-29a-3p, ad esempio, è correlato positivamente in otto tessuti, mentre miR-300p, miR-487b-

3p e miR-541-5p sono correlati negativamente e in cinque tessuti diversi ciascuno.

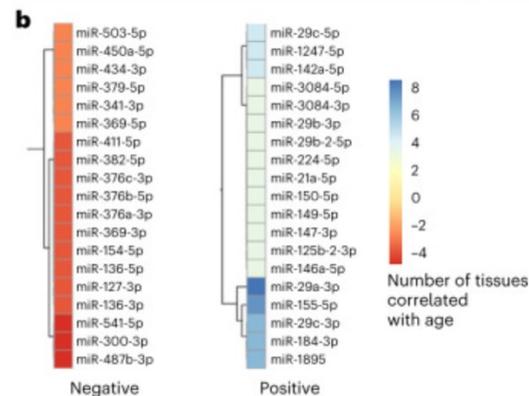


Figura 17: mappa di miRNAs (anti-)correlati con l'età in almeno due tessuti, colorati per numero di tessuti (anti-)correlati e divisi tra miRNAs positivamente e negativamente correlati.

Sulla base di queste osservazioni, si sono suddivisi i miRNAs in tre categorie: miRNAs non correlati all'invecchiamento, miRNAs correlati all'invecchiamento locale e miRNAs correlati all'invecchiamento globale.

Tramite ciò, si sono identificati i tre miRNAs globali negativamente correlati, citati prima (miR-300p, miR-487b-3p e miR-541-5p) e altri cinque miRNAs globali positivamente correlati (miR-29a-3p, miR-29c-3p, miR-155-5p, miR-184-3p e miR-1895).

Oltre alla correlazione lineare appena descritta, si sono identificati anche cambiamenti di espressione correlati all'età non lineari: usufruendo della linea temporale di 3 mesi come base, si sono calcolati i *foldchanges* (FCs: miRNAs calcolati a 10, 20, 25 mesi in rapporto a quelli a 3 mesi) e i rispettivi *P-values* (per valutare la significatività statistica: livello soglia del 5%), e identificati determinati miRNAs deregolati (Fig. 18).

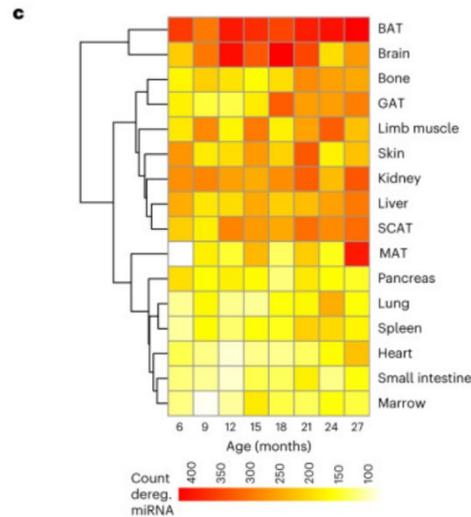


Figura 18: conteggio di miRNAs deregolati in ogni tessuto e in ogni punto temporale. I miRNAs deregolati sono stati ottenuti calcolando i FCs dei timepoints *versus* 3 mesi di età. miRNAs con FCs = 3/2 sono considerati deregolati.

Si nota come la maggior parte dei miRNAs sia deregolata nel tessuto adiposo bruno (BAT). Anche per quanto riguarda il cervello, la maggior parte dei miRNAs deregolati mostra un picco all'età di 12 (412 miRNAs deregolati) e 18 mesi (427 miRNAs deregolati).

Per poter valutare la presenza di *pattern* comuni tra le variazioni non lineari nel tempo, si sono calcolati i punteggi *z-score* per tutti i miRNAs espressi in ogni tessuto, clusterizzandoli in 20 categorie che si sono rivelate organo-specifiche.

Il 50% dei miRNAs nel cluster 2, ad esempio, ha origine nella pelle, con un picco a 3 mesi e un aumento tardivo di nuovo a 24 mesi.

Il cluster 9, invece, mostra un picco a 12 e 18 mesi, con un 61,2% di miRNAs cerebrali.

Il cluster 13 è costituito da miRNAs la cui espressione aumenta continuamente dall'età di 6 mesi, con specificità per il BAT (Fig. 19).

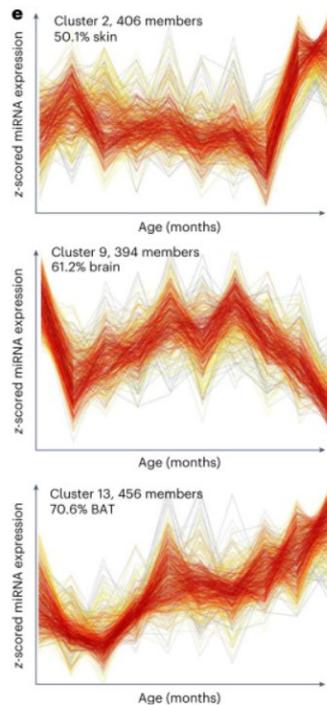


Figura 19: clusterizzazione tramite z-score delle traiettorie dei miRNAs dell'intero organismo. Sono stati ottenuti 20 cluster, di cui 3 vengono visualizzati come esempi, mostrando firme di miRNA specifiche del tessuto.

Il cluster 2 è composto per il 50,1% da miRNAs provenienti dalla pelle, il cluster 9 per il 61,2% da miRNAs del cervello, e il cluster 13 per il 70,6% da miRNAs dal BAT.

Si è concluso che 10 dei 20 cluster fossero tessuto-specifici, con almeno il 30% di miRNAs proveniente da un singolo tessuto.

I miRNAs globali dell'invecchiamento, di conseguenza, costituiscono un'eccezione a questa clusterizzazione tessuto-specifica: traiettorie molecolari in cui sono implicati, ad esempio, il miR-29a-3p e il miR-29c-3p (citati precedentemente come miRNAs globali correlati positivamente con l'età), sono state identificate rispettivamente in dieci e otto diversi tessuti nel cluster 20 (Fig. 20), e aumentano in modo continuativo con l'età.

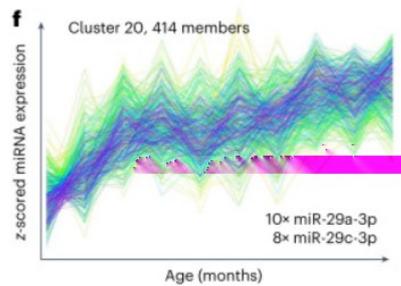


Figura 20: cluster 20 che contiene due miRNA globali dell'invecchiamento, miR-9a-3p da 10 differenti tessuti e miR-29c-3p da otto.

Questa scoperta potrebbe configurarsi in traiettorie regolatrici chiave in tutti gli organi durante l'invecchiamento<sup>7</sup>.

### 3.7 I miRNAs circolanti dell'invecchiamento globale

Come riportato nelle analisi precedenti, sono stati identificati cinque miRNAs come biomarcatori di invecchiamento globale, la cui espressione aumenta con l'età; con essi, ci si aspetta una concomitante repressione dei geni bersaglio. Per questo motivo, si è deciso di correlare i livelli di espressione dei miRNAs con gli mRNAs del dataset *TMS*.

Prima di tutto si è deciso di identificare i *targets* tramite correlazione inversa (aumento miRNA = diminuzione mRNA), il tutto validato da un confronto con le interazioni miRNA-mRNA predette con siti di legame conservati per i miRNAs. Come controllo, invece, si sono usate le interazioni miRNA-mRNA predette tramite correlazione positiva.

Per 9 delle 122 interazioni miRNA-mRNA identificate come correlate inversamente, si è trovato almeno un sito di legame conservato per il miRNA, rispetto al 2,1 % delle interazioni del controllo *TMS*.

Dato che ogni gene contiene più siti di legame su più 3'UTR, e i siti mostrano diverse forze, si è deciso di ripetere l'analisi per ogni tipo di sito di legame: in questo modo, si è potuto constatare che il sito di legame 8mer conservato è 6,3 volte superiore rispetto al controllo, i siti 7mer-8m conservati sono 3,8 volte superiori, e infine i siti 7mer-

la conservati sono 9,0 volte superiori. I siti 7mer e 8mer sono importanti perché l'efficacia di un miRNA dipende in gran parte dalla complementarità della sua sequenza con quella del gene bersaglio mRNA: l'appaiamento perfetto può causare la degradazione del *target*, oppure la sua inibizione traduzionale, inficiandone così l'espressione genica.

Successivamente all'analisi delle interazioni, si è potuto osservare una condivisione di determinati *targets* da parte di tutti i miRNAs: in particolare, *Eln*, *Colla1* e *Col3a1*; questi ultimi hanno un ruolo nella digestione e nell'assorbimento proteico, e codificano per proteine della matrice extracellulare (ECM). Essi sono già bersagli validati per miR-29b e miR-29a. È noto, infatti, che le cellule senescenti mostrano un'espressione alterata dei geni che interagiscono con la ECM, esprimendo dunque il cosiddetto "fenotipo secretorio associato alla senescenza".

Altri geni bersaglio identificati codificano, invece, per proteine correlate alla proteolisi dipendente dal sistema Ubiquitina-Proteasoma, alla modificazione istonica, o all'attivazione trascrizionale: vengono, quindi, invalidati meccanismi molecolari quali la Segnalazione AGE-RAGE nelle complicanze diabetiche, o il Targeting dei miRNAs nella segnalazione dell'insulina/PI3K-AKT.

Insieme alle traiettorie molecolari di miRNAs sistemici, sono stati arricchiti anche i percorsi per i bersagli dei miRNAs di invecchiamento locale: il percorso di segnalazione PI3K-AKT, la digestione e adsorbimento delle proteine, le vie metaboliche, la via di segnalazione delle adipocitochine, e la resistenza all'insulina sono stati identificati, infatti, tra i primi 20 percorsi localmente arricchiti nei mRNAs bersaglio (Fig. 21).



I *targets*, infatti, hanno mostrato un arricchimento funzionale per percorsi implicati nel sistema immunitario, come l'interazione citochina-recettore, la differenziazione delle cellule Th1, Th2 e Th17, la via di segnalazione delle chemochine, la via di segnalazione NF-kappa B, bersagli legati all'immunità adattativa, all'immunoglobulina, alla linea ematopoietica, all'attività recettoriale e a quella citochinica.

La senescenza immunitaria e l'infiammazione sono considerati, proprio per questo, segni caratterizzanti dell'invecchiamento.

La finalità dell'esperimento di parabiosi eterocronica era proprio quello di constatare gli effetti benefici del sangue giovane in un topo eterocronico anziano (HA), tramite circolazione comune condivisa. Il ringiovanimento, tuttavia, si accompagna a un invecchiamento accelerato, effetto negativo sui topi eterocronici giovani (HY) che condividono il sangue con i topi HA.

L'effetto di ringiovanimento (REJ) è stato valutato confrontando i livelli di espressione nei topi isocronici anziani (IA) con quelli rilevati nei topi HA; allo stesso modo, l'effetto di invecchiamento accelerato (ACC) è stato misurato tramite confronto tra topi isocronici giovani (IY) e topi eterocronici giovani (HY) (Fig. 23).

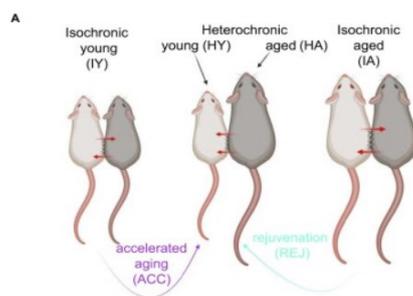


Figura 23: riassunto schematico della parabiosi eterocronica.

L'invecchiamento sano (AGE), inoltre, è stato definito tramite confronto tra i topi della coorte *TMS* di 3 e 21 mesi.

Si sono quindi assegnati i miRNAs deregolati come: (1) deregolati unicamente nel ringiovanimento (REJ unico) o nell'invecchiamento

accelerato (ACC unico) o (2) deregolati nell'invecchiamento sano e insieme nel ringiovanimento (REJ up e AGE down, o REJ down e AGE up) o nell'invecchiamento accelerato (AGE/ACC up/down). Si sono identificati 233 miRNAs deregolati REJ unico e 43 ACC unico (Fig. 24).

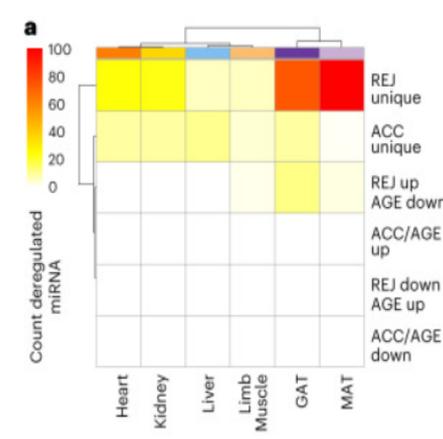


Figura 24: numeri di miRNAs deregolati durante la parabiosi, classificati per REJ/ACC unico, oppure REJ/ACC up/down e AGE up/down.

Per il miR-29c-3p, in particolare, si è misurato un forte effetto di ringiovanimento nel fegato; la stessa tendenza vale, anche se con magnitudine inferiore, anche per gli altri due miRNAs globali miR-184-3p nel fegato e miR-300-5p nel GAT<sup>7</sup>.

#### 4. DISCUSSIONE

##### 4.1 L'espressione della famiglia di miRNAs circolanti miR-29 aumenta con l'invecchiamento

I miRNAs che possono circolare, tramite il plasma e le vescicole extracellulari (EVs), tra i vari organi e tessuti, sono ritenuti responsabili degli effetti di invecchiamento sistemico. L'esperimento di parabiosi eterocronica, infatti, valida l'ipotesi secondo cui i fattori circolanti permettano il ringiovanimento da un lato, l'invecchiamento accelerato dall'altro.

Si è valutata l'abbondanza del miR-29c-3p sia nel plasma sia nelle EVs, tramite lo studio di una coorte indipendente: si è analizzata la sua espressione in cinque punti temporali distinti, e si è potuto così

evincere un sostanziale aumento di espressione correlato all'età in entrambe le frazioni (plasma ed EVs). Inoltre, la quota circolante di miR-29c-3p di invecchiamento globale positivo era maggiore della quota dello stesso miRNA ma di invecchiamento locale.

Recentemente, si è scoperto che alcuni miRNAs con specifiche sequenze sono più facilmente secreti in piccole EVs e hanno un'attività di inibizione dei geni bersaglio potenziata nelle cellule riceventi: un "EXOmotif" studiato è, ad esempio, CNGGNC, analogo ad una sequenza del mmu-miR-29c-3p.

Tramite esperimenti di luciferase assay, inoltre, si sono convalidati ulteriori *targets* ad alta affidabilità della famiglia miR-29, tra cui *Lox*, *Adamts17* e *Vash1*. Insieme ai bersagli già noti, quali *Eln*, *Colla1* e *Col3a1*, essi giocano ruoli fondamentali nei processi della ECM (Fig. 25), il che conferma che i miRNAs della famiglia miR-29 hanno una funzione chiave nell'invecchiamento sistemico dell'organismo per la loro attività repressiva su questi bersagli.

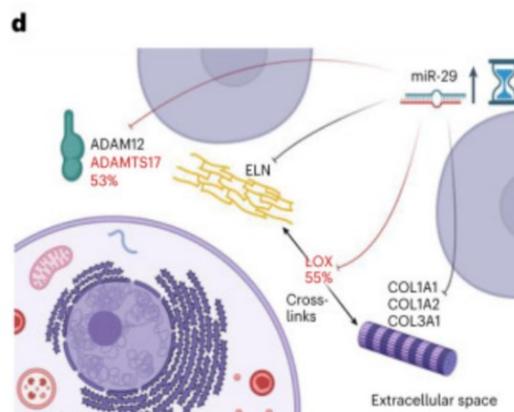


Figura 25: riassunto dei targets validati della famiglia miR-29, visualizzati per la loro localizzazione cellulare. Questi bersagli sono fondamentali nei processi correlati alla ECM.

Questo studio ha ampliato i dataset trascrittomici di *TMS* e parabiosi eterocronica tramite sequenziamento bulk e single-cell di ncRNAs: si sono evidenziati arricchimenti funzionali nei miRNAs per i percorsi correlati alla resistenza all'insulina, al rilevamento dei nutrienti, al sistema immunitario, alla ECM, e così via.

Si sono identificati sia miRNAs di invecchiamento locale sia miRNAs di invecchiamento globale, le cui espressioni possono essere invertite parzialmente con la condivisione della circolazione tramite parabiosi eterocronica; concentrandosi sul miR-29c, si nota una sua implicazione funzionale nell'invecchiamento sistemico: esso, infatti, regola negativamente RAG1 nei linfociti B nei topi ed esseri umani, e la sua sovraespressione riduce la ricombinazione V(D)J necessaria per costituire linfociti funzionanti differenziati.

Una patologia correlata, che valida l'ipotesi che l'effetto dell'aumento di questo particolare miRNA in diversi tessuti aggravi il fenotipo dell'invecchiamento, è la senescenza cellulare, regolata dalla via TGF- $\beta$ /Smad. Quest'ultima, infatti, provoca la perdita, indotta da miR-29, di H4K20me2, che promuove la senescenza.

Le ricerche future dovrebbero, tuttavia, concentrarsi su miRNAs a livello di singola cellula e a livello vescicolare, per poter valutare gli specifici tipi di cellule responsabili dell'espressione dei marcatori di invecchiamento. Infatti, si è notato come gli effetti di ringiovanimento più forti mediati dal miR-29c-3p siano avvenuti all'interno del fegato, in particolare degli epatociti.

Sarebbe fondamentale anche ampliare la ricerca ai cambiamenti che influenzano il trascrittoma e il proteoma nei vari tessuti, dato che i *targetomi* dei miRNAs variano anche tra tipologie cellulari.

Un ulteriore problema riscontrato in questa analisi è la produzione di librerie di piccoli RNAs, nel quale si evidenziano bias di ligazione degli adattatori, contaminazioni da dimeri di adattatore, bias di amplificazione tramite PCR, o bias del codice a barre.

In conclusione, questo esperimento ha fornito un dataset di ncRNAs espressi in tutti gli organi principali lungo l'intera vita del topo, implementato con i dati di ncRNAs di invecchiamento sano utilizzati come biomarcatori specifici dell'età.

È fondamentale, tuttavia, che le traiettorie di invecchiamento fisiologico vengano definite non solo nel sangue ma anche in ogni organo solido, al fine di sviluppare nuove terapie basate sull'RNA<sup>7</sup>.

## 5. BIBLIOGRAFIA

1. Dziechciaż M, Filip R. Biological psychological and social determinants of old age: Bio-psycho-social aspects of human aging. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2014;21(4):835-838. doi:10.5604/12321966.1129943  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25528930/>
2. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*. 2023;186(2):243-278. doi:10.1016/j.cell.2022.11.001;  
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2499-y>
3. Campisi J, Kapahi P, Lithgow GJ, Melov S, Newman JC, Verdin E. From discoveries in ageing research to therapeutics for healthy ageing. *Nature*. 2019;571(7764):183-192. doi:10.1038/s41586-019-1365-2;  
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1365-2>
4. Thum T. Non-coding RNAs in ageing. *Ageing Res Rev*. 2014;17:1-2. doi:10.1016/j.arr.2014.08.001;  
<https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.08.001>
5. Kern F, Krammes L, Danz K, et al. Validation of human microRNA target pathways enables evaluation of target prediction tools. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(1):127-144. doi:10.1093/nar/gkaa1161;  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7797041/>
6. Li CJ, Fang QH, Liu ML, Lin JN. Current understanding of the role of adipose-derived extracellular vesicles in metabolic homeostasis and diseases: Communication from the distance between cells/tissues. *Theranostics*. 2020;10(16):7422-7435.

doi:10.7150/thno.42167;

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7330853/>

7. Wagner V, Kern F, Hahn O, et al. Characterizing expression changes in noncoding RNAs during aging and heterochronic parabiosis across mouse tissues. *Nat Biotechnol.* 2024;42(1):109-118. doi:10.1038/s41587-023-01751-6; <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01751-6>
8. Róbert Pálovics. Molecular hallmarks of heterochronic parabiosis at single cell resolution. Published online 2022. doi:10.5281/zenodo.5762659; <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04461-2>
9. Szczyrba J, Jung V, Beitzinger M, et al. Analysis of Argonaute Complex Bound mRNAs in DU145 Prostate Carcinoma Cells Reveals New miRNA Target Genes. *Prostate Cancer.* 2017;2017. doi:10.1155/2017/4893921; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5253174/>