

UNIVERSITÀ CATTOLICA DEL SACRO CUORE  
MILANO

Dottorato di ricerca in Biotecnologie Molecolari  
ciclo XIX  
S.S.D. AGR/16

TWO DIFFERENT ASPECTS OF GENOMICS: THE CONSTRUCTION  
OF A HIGH-DENSITY RADIATION HYBRID MAP AND THE STUDY OF  
THE INVOLVEMENT OF MIRNAS IN THE MAMMARY GLAND

(DUE DIFFERENTI ASPETTI DELLA GENOMICA: LA COSTRUZIONE  
DI UNA MAPPA DI IBRIDI DI RADIAZIONE AD ALTÀ DENSITÀ E LO  
STUDIO DEL COINVOLGIMENTO DEI MIRNAS NELLA GHIANDOLA  
MAMMARIA)

Tesi di dottorato di : SILVERI LICIA  
Matricola : 3280012

Anno Accademico 2005/2006



**UNIVERSITÀ CATTOLICA DEL SACRO CUORE  
MILANO**

**Dottorato di ricerca in Biotecnologie Molecolari  
ciclo XIX  
S.S.D. AGR/16**

**TWO DIFFERENT ASPECTS OF GENOMICS: THE CONSTRUCTION OF A  
HIGH-DENSITY RADIATION HYBRID MAP AND THE STUDY OF THE  
INVOLVEMENT OF MIRNAS IN THE MAMMARY GLAND**

**(DUE DIFFERENTI ASPETTI DELLA GENOMICA: LA COSTRUZIONE DI  
UNA MAPPA DI IBRIDI DI RADIAZIONE AD ALTA DENSITÀ E LO STUDIO  
DEL COINVOLGIMENTO DEI MIRNAS NELLA ghiandola mammaria)**

**Coordinatore: Ch. mo Prof. MORELLI LORENZO**

**Tesi di dottorato di : SILVERI LICIA  
Matricola : 3280012**

**Anno Accademico 2005/2006**

## **Thanks**

I would like to thank my supervisor, Paolo Ajmone-Marsan, who gave me the possibility to join his group and to catch all the formative good opportunities that appeared in this triennium of doctorate.

A special thanks to Fabienne LeProvost and her group, who followed me and taught me with care and attention.

I would like to remember also André Eggen, who accepted me in his lab for some months, and Sandrine Floriot, who helped me in the first months of my stage in France.

A thanks also to all the people of the group of Paolo Ajmone-Marsan, for their affection and their friendly presence in the lab.

A special thanks to Andrey, for his intellectual and moral support always present, even from far...and to my mother and my father, for their material and moral help, and for their constant will to infuse me the faith in my capacities.

Alla piccola Sofia, che è ancora nella mia pancia, ma ha già portato una nuova gioia nella mia vita, che mi ha aiutato anche nella scrittura di questa tesi.

...nella speranza che un giorno lei legga e sia orgogliosa della sua mamma.

## INDEX

Sintesi	8
General Introduction: The aims of genomics in the 21's century era	11
First part : A High-density radiation hybrid map construction	18
I-Introduction	18
I-I The objectives of livestock genomics	18
I-II Genetic maps : brief history	18
I-III Molecular markers	19
I-IV Genetic linkage maps	20
I-V Somatic hybrids and FISH	21
I-VI BAC-based physical maps	22
I-VII Comparative maps	23
I-VIII Radiation hybrid maps	24
I-VIII-a Advantages of RH maps	25
I-VIII-b Principle of construction of RH panels	25
I-VIII-c RH panel characteristics and uses	26
I-VIII-d Software used to construct RH maps	27
I-VIII-e RH bovine panels and maps	27
I-VIII-f Integration of bovine RH map data in the construction of comparative maps	28
I-VIII-g Integration of bovine RH map data with genetic linkage maps	30
I-IX International bovine projects	32
I-IX-a International physical map and Bovine sequencing projects	32
I-IX-b The BovGen project	33
II-Objective	35
III-Materials and Methods	36
III-I Sequencing of ESTs	36
III-II Primer design	36
III-III Screening of the Roslin RH Panel	37
III-IV RH data analyses	37
III-V Mapping of marker associated sequences against the bovine sequence assembly	37
III-VI Diagrammatic representation of chromosomal maps	38

IV-Results	39
IV-I Radiation hybrid map	39
IV-II Comparison with the ILTX RH map	40
IV-III Comparison with MARC 2004 linkage map	41
IV-IV Comparison with the 6X bovine assembly	46
V-Discussion	50
V-I Comparison with other linkage and RH maps	50
V-II Comparison with the sequence assembly	51
V-III Assignments of markers to different chromosomes	52
V-Conclusions	53
VI-Reference	54
Second part : The microRNA in the mammary gland	63
I-Introduction	63
I-I The miRNA	63
I-I-a RNA silencing and miRNA	63
I-I-b The discovery of miRNAs	64
I-I-c Biogenesis and mechanism of action	66
I-I-d Approaches to microRNA discovery	71
I-I-e Strategy to determine biological functions	74
I-I-f MiRNAs and Cell differentiation in mammalian development	78
I-I-g MiRNAs and cancer	81
I-II The mammary gland	84
I-II-a The mammary gland: structure and cellular composition	84
I-II-c The development of mammary gland	85
I-II-d Endocrine control on mammary development	87
I-II-e Role of extracellular matrix on mammary development	90
I-II-f The miRNAs in the mammary gland	92
II-Objective	93
III-Materials and Methods	94
III-I Animals sampled	94
III-II RNA extraction and Northern Blot analyses	94
III-III Construction of miRNA libraries	95

III-III-a Clonage of low-molecular weight RNAs	96
III-III-b Reverse-transcription and amplification	98
III-III-c Ban I digestion and concatamerization	98
III-III-d Ligation and transformation	99
III-III-e PCR from colony	99
III-III-f Preparation of recombinant plasmidic DNA and sequencing of the inserts	100
III-III-g Analyses of the cloned fragments	100
III-IV-Validation of the potential miRNA	101
III-IV-a Construction of the precursor sequences	101
III-IV-b Construction of the expression vector	102
III-IV-c Ligation, transformation and sequencing	103
III-IV-d DNA plasmidic preparation	104
IV-IV-e Transfection test	104
IV-Results and discussion	105
IV-I Detecting miRNAs in mouse mammary gland	105
IV-II Characterization of miRNA expression profile in MG	107
IV-III Characterization of miRNA expression profile in different organs	112
IV-IV Detecting miRNA cellular origin	113
IV-V Cloning new miRNA in mammary gland	115
IV-VI Validating potential miRNAs	117
IV-VI-a Evaluating the precursor secondary structure	118
IV-VI-b Searching for miRNAs expression	122
IV-VI-c Testing miRNA maturation	126
V-Conclusions	128
V-I State of art about miRNA involvement in mammary gland	128
V-II miRNA expression in mammary gland	129
V-III Characterization of miRNA expression profile	130
V-IV Analysis of organ- or tissue- miRNA specificity	132
V-V Construction of miRNA libraries	133
V-VI Validation of potential miRNA	134
V-VII Perspectives	135
Attached 1	137
VI-Reference	139
Publications	152

## Sintesi

In questa tesi vengono presentati due studi differenti.

Il primo, svolto sotto la supervisione del professore P. Ajmone-Marsan dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza, consiste in una ricerca svolta nel quadro di un progetto finanziato dalla Comunità Europea, chiamato 'BovGen', per lo sviluppo di tecnologie utili allo studio del genoma bovino. In particolare il progetto prevedeva lo sviluppo di un *array* contenente 20000 EST (*Expressed Sequence Target*) bovine non ridondanti, di una mappa RH (*Radiation Hybrids*) bovina ad alta risoluzione finalizzata alla costruzione di mappe comparative uomo-bovino, l'assemblaggio dei frammenti bovini genomici già sequenziati in un unico *contig* e il completamento della sequenza dell'intero genoma bovino. Questi strumenti permettono l'identificazione molecolare e lo studio dell'espressione genica di caratteri importanti per il miglioramento genetico dei bovini e una migliore qualità della produzione alimentare.

Nell'ambito di questa tesi inizialmente è stata sviluppata una mappa RH del genoma bovino ad alta densità di marcatori. In particolare, la mappa è stata costruita attraverso la caratterizzazione genica di un pannello 3000-rad di 94 linee cellulari ibride bovino-criceto, precedentemente sviluppato al Roslin Institute di Edimburgo, aggiungendo nuovi marcatori alla mappa RH bovina di prima generazione (William et al., 2002).

Il pannello è stato tipizzato con marcatori EST: dapprima, un set non ridondante di EST è stato selezionato da una libreria di cloni a cDNA derivante da cervello bovino (Herwing et al., dati non pubblicati); tali EST sono state quindi sequenziate e allineate con la sequenza del genoma bovino e, tramite il software *Polyprimers* (<http://www.unitus.it/SAG/primers.zip>), sono state disegnate coppie di primer in grado di amplificare le EST nel genoma degli ibridi bovino-criceto.

A seguito dello screening tramite PCR del pannello RH 2473, ai 30 cromosomi bovini sono stati assegnati nuovi marcatori che sono stati infine integrati nella mappa precedente: questa conteneva già 1497 marcatori, di cui 262 marcatori AFLP (*Amplified Length Polymorphism*) e altri marcatori, tra cui microsatelliti, BAC (*Bacterial Artificial Chromosomes*), *end sequences* e EST già localizzate. La mappa di ogni cromosoma è stata disegnata utilizzando software quali *RH Mapper* (Slonim et al., 1997) e *Carthagene* (Schiex and Gaspin, 1997) ed è disponibile al sito <http://www.thearkdb.org> (ArkDB public database).

La lunghezza totale della mappa prodotta è 760 Rays e la distanza media tra due marcatori è 19cR.

La mappa di ogni marcatore è stata allineata e confrontata con la mappa RH Illinois-Texas (ILTX) (Everts-van der Wind et al., 2004), precedentemente costruita caratterizzando un pannello RH 5000-rad di 90 linee cellulari ibride (Womack et al., 1997), e con la recente mappa bovina genetica di linkage MARC 2004 ad alta densità di microsatelliti (Ihara et al.,



2006). Inoltre, la mappa RH sviluppata durante questo lavoro di ricerca è stata confrontata con la versione più aggiornata della sequenza del genoma bovino (Btau\_2.0).

Questa analisi ha evidenziato che l'ordine dei marcatori lungo i cromosomi della mappa RH prodotta è in generale accordo con le prime due mappe, mentre si osservano maggiori inconsistenze tra la mappa prodotta e il recente assemblaggio della sequenza bovina: questo ha permesso di individuarne gli errori e di migliorarne la successiva versione.

Il secondo lavoro di ricerca svolto di questa tesi, svolto in Francia presso l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) di Jouy-en-Josas sotto la supervisione di F. LeProvost, ha avuto come oggetto il ruolo dei microRNA durante lo sviluppo della ghiandola mammaria.

I microRNA sono una classe di piccole molecole regolatrici, e spesso inibitrici, dell'espressione genica. Dal momento che numerose evidenze sperimentali dimostrano che questi piccoli RNA non codificanti possiedono un ruolo chiave nei processi di proliferazione, differenziazione cellulare e organogenesi (Ambros, 2004; Jason et al., 2006 etc.), è stato ipotizzato un loro coinvolgimento anche nello sviluppo della ghiandola mammaria di topo durante il ciclo riproduttivo.

Tramite la tecnica *Northern blot*, è stata esaminata l'espressione nella ghiandola mammaria di topo di un primo gruppo di 25 microRNA, scelti dalla letteratura tra quelli espressi nella ghiandola mammaria dell'uomo o perchè differenzialmente espressi in tessuti cancerosi della mammella umana.

Fra i microRNA testati, 10 sono risultati espressi anche nella ghiandola mammaria del topo e ne è stata caratterizzata l'espressione durante i diversi stadi dello sviluppo: lo stadio di vergine a 4 e a 8 settimane; durante la gestazione, a 4, a 6, a 9, a 12 e a 18 giorni; durante la lattazione, a 1 e a 3 giorni, e, dopo l'allontanamento dei piccoli, durante lo stadio di involuzione, a 1, a 3 e a 6 giorni. La quantificazione dell'espressione genica ha dimostrato un andamento variabile nei diversi stadi del ciclo riproduttivo, che denota un controllo dell'espressione genica dei microRNA durante lo sviluppo dell'organo.

Ogni microRNA ha un profilo tipico d'espressione; tuttavia sono state osservate alcune caratteristiche comuni a tutti i piccoli RNA, quali una diminuzione dell'espressione durante la lattazione e un incremento durante l'involuzione. Questo potrebbe suggerire una correlazione con lo sviluppo del tessuto epiteliale, che raggiunge il completo differenziamento durante la lattazione e va in apoptosi allo stadio dell'involuzione, oppure una correlazione con l'andamento di alcuni ormoni importanti nello sviluppo della ghiandola mammaria, quali la prolattina.

L'esame dell'espressione dei microRNA è stato approfondito ricercando l'origine cellulare della loro produzione tramite analisi *Northern blot* di ghiandole mammarie prive di tessuto epiteliale di topi precedentemente operati. Il confronto con ghiandole mammarie normali ha dimostrato che i microRNA analizzati vengono espressi anche in ghiandole mammarie prive di tessuto epiteliale. Inoltre l'espressione genica di questi microRNA è stata ricercata e

verificata in 9 differenti organi murini ed è stato riscontrato che essi non sono specifici della ghiandola mammaria.

Una libreria di cloni di microRNA è stata costruita a partire da RNA estratto a differenti stadi dello sviluppo dell'organo (vergine di 8 settimane, gestazione a 2, a6, e a 18 giorni, involuzione a 1 giorno) seguendo il protocollo di Lagos-Quintana et al., 2003.

Sono stati clonati 64 frammenti non-ridondanti della lunghezza tipica di un microRNA (19-25 nucleotidi).

Le sequenze dei frammenti clonati sono state analizzate per identificare la loro eventuale identità o omologia di sequenza con microRNA già depositati nel microRNA Registry (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna>): la presenza nella libreria di due piccoli RNA noti, *let-7b* e *let-7c*, ha convalidato la tecnica utilizzata in questo lavoro di tesi.

Allo scopo di identificare e convalidare i microRNA presenti nella libreria, le sequenze dei frammenti clonati sono state mappate nel genoma murino (<http://www.ensembl.org>) e, per una frazione di queste (10 frammenti), è stata predetta, tramite l'uso del programma *Mfold*, ([www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna](http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna)), la struttura secondaria tipica del precursore di un microRNA nella regione genomica di localizzazione.

Successivamente, per 5 potenziali microRNA clonati è stata verificata e caratterizzata l'espressione a diversi stadi dello sviluppo della ghiandola mammaria e in 9 altri organi murini. Questi piccoli RNA hanno dimostrato avere un profilo variabile durante lo sviluppo dell'organo ed essere espressi in tutti i tessuti, anche se prevalentemente nella ghiandola mammaria.

Infine per altri 2 potenziali microRNA è stata indotta e verificata *in vitro* la maturazione a partire dall'espressione del potenziale precursore, dimostrando l'attività dell'enzima che taglia il precursore generando il microRNA maturo, l'enzima Dicer, e confermandoli quali candidati microRNA.