



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN
FARMACOLOGIA E ONCOLOGIA MOLECOLARE

CICLO XXIV

COORDINATORE Prof. Antonio Cuneo

Ruolo del miR-221 nella tumorigenesi epatica

Settore Scientifico Disciplinare MED/06

Dottorando

Dott. Lupini Laura

(firma)

Tutore

Prof. Negrini Massimo

(firma)

Anni 2009/2011

SOMMARIO

ABSTRACT	1
ABSTRACT (English)	3
INTRODUZIONE	5
I microRNA: biogenesi e funzione.....	5
MicroRNA e cancro	7
MicroRNA ed epatocarcinoma.....	10
miR-221	14
Scopo del lavoro.....	16
MATERIALI E METODI.....	17
Campioni clinici epatici.....	17
Linee cellulari e transfezioni	17
RT-PCR e Real Time per valutare l'espressione del miR-221	18
Analisi mediante Sylamer	19
Preparazione dei cloni stabili di cellule SNU-398 sovra-esprimenti miR-221	19
Studio delle vie di segnale indotte dal miR-221.....	20
RT-PCR e Real Time per valutare l'espressione genica, mediante EvaGreen	21
Preparazione dei costrutti luciferasici su vettore psiCHECK.2	22
Saggio di attività luciferasica per valutare l'interazione tra miR-221 e le sequenze ad esso complementari sul 3'UTR dei geni in esame	24
Western Blot.....	24
Saggio di attività luciferasica per valutare l'efficacia del promotore EII- α 1AT.....	25
Costruzione del plasmide pWhere-EII- α 1AT-miR221	26
Produzione del topo transgenico sovra-esprimente miR-221.....	26
Studi in vivo	27
Analisi immunostochimiche.....	28
Analisi microarray.....	28
Analisi statistiche	29
RISULTATI	31
Valutazione dell'espressione del microRNA-221 in campioni clinici di fegato umani.....	31
Identificazione di bersagli genici del miR-221	33
Studio delle vie di segnale cellulari indotte dal miR-221	37

Validazione di nuovi geni bersaglio del miR-221	43
Creazione di un topo transgenico in grado di sovra-esprimere miR-221 nel fegato.	52
Caratterizzazione molecolare del fegato dei topi transgenici.....	55
I topi transgenici sviluppavano tumori epatici sovra-esprimenti miR-221	58
La somministrazione di anti-miR-221 era in grado di contrastare gli effetti del miR-221 e di inibire la tumorigenesi nei topi transgenici	62
DISCUSSIONE.....	65
CONCLUSIONI.....	78
BIBLIOGRAFIA	79

ABSTRACT

I microRNA (miRNA) sono una classe di piccoli RNA non codificanti, in grado di modulare l'espressione genica a livello post-trascrizionale. L'alterata espressione di miRNA è coinvolta in patologie umane, inclusi i tumori. Scopo del lavoro è stato studiare funzioni bio-molecolari del microRNA-221, la cui importanza è legata al fatto che la sua espressione è aumentata in modo aberrante in diversi tipi di tumori.

Gli studi di questo lavoro si sono concentrati sull'epatocarcinoma (HCC). Attraverso l'analisi di una casistica di 70 campioni derivati da fegato sano, cirrosi epatica ed epatocarcinoma, è stato dimostrato che il miR-221 presenta una sovra-espressione nel 80% dei tumori rispetto ai tessuti epatici non-neoplastici dello stesso paziente.

Studi molecolari mirati a comprendere i meccanismi deregolati dalla sovra-espressione del miR-221, hanno già dimostrato che il miR-221 controlla i livelli degli inibitori del ciclo cellulare CDKN1B/p27 e CDKN1C/p57 e della proteina pro-apoptotica Bcl-2. Per approfondire lo studio, è stata svolta un'analisi dei trascritti modulati dopo espressione forzata di miR-221 in cellule SNU-398 (derivate da HCC). Attraverso l'analisi dell'espressione dell'intero trascrittoma e l'utilizzo di uno specifico algoritmo (Sylamer), è stato possibile dimostrare che numerosi geni regolati negativamente presentano omologia per miR-221, fornendo così utili indicazioni per nuovi bersagli genici di questo miRNA. Le vie molecolari su cui insistono significativamente i geni modulati da miR-221 sono risultate legate alla regolazione del ciclo cellulare e dell'apoptosi. Per verificare i risultati ottenuti dall'analisi Sylamer, alcuni dei nuovi potenziali bersagli sono stati convalidati sperimentalmente. Tra questi, i geni del retinoblastoma 1 (RB1) e WEE1, inibitori del ciclo cellulare, apoptotic peptidase activating factor 1 (APAF1), gene pro-apoptotico, Annessina A1 (ANXA1) e CCCTC-binding factor (CTCF), un repressore trascrizionale. Questi risultati dimostrano che la sovra-espressione del miR-221 è in grado di modulare numerosi geni identificati nel presente studio e suggerisce che la risultante alterazione delle vie molecolari connesse abbia un ruolo nell'insorgenza del HCC.

Per provare il ruolo oncogenico del miR-221, è stato creato un ceppo di topi transgenici che sovra-esprimono il miR-221 nel fegato. Gli alti livelli di miR-221 misurati nel tessuto epatico dei topi e la bassa espressione di alcune proteine bersaglio del miR-221 (p27, p57

e BMF), hanno dimostrato la funzionalità del modello. In questi topi transgenici, ma non nei controlli, è stata osservata l'insorgenza di HCC spontanei nel 50% degli animali di sesso maschile. Nel ceppo transgenico, il trattamento con il carcinogeno dietilnitrosammina (DENa) causa la comparsa di numerosi tumori epatici visibili entro il quarto mese di vita, notevolmente più grandi e numerosi rispetto ai topi wild type trattati con lo stesso cancerogeno. La valutazione dei livelli di miR-221 e delle sue proteine bersaglio ha dimostrato che il miR-221 era espresso ad alti livelli e funzionante in questi tumori. Il ruolo fondamentale del miR-221 nell'indurre tumori nei topi transgenici è stato convalidato attraverso l'iniezione di un oligonucleotide anti-miR-221; questo trattamento ha causato una significativa diminuzione del numero e della dimensione dei noduli tumorali epatici.

I risultati di questo lavoro contribuiscono a definire il ruolo oncogenico del miR-221 ed i meccanismi molecolari sottostanti. Inoltre i risultati ottenuti dall'utilizzo di anti-miR-221 suggeriscono una potenziale efficacia di molecole in grado di contrastare l'azione del miR-221 come farmaci antitumorali.

ABSTRACT (English)

MicroRNAs are short non-coding RNA molecules, involved in post-transcriptional gene expression regulation. Their aberrant expression is involved in several pathological conditions, including cancer. MicroRNA-221 was frequently found overexpressed in human neoplasms. This study focused on biological and molecular function of miR-221 in hepatocellular carcinoma (HCC).

By analyzing miR-221 expression in 70 clinical samples from normal liver, cirrhosis and hepatocellular carcinoma we found miR-221 overexpression in 80% of cancer samples, compared to non-neoplastic tissues, suggesting that this microRNA played an important role in HCC development.

Previous molecular studies identified some miR-221 target genes, that were involved in cell cycle inhibition and apoptosis. To further understand miR-221 molecular role in hepatocellular carcinoma development, gene expression profile of miR-221-transfected-SNU-398 cells (derived from human liver cancer) was analyzed through microarray assay and Sylamer algorithm. Results revealed that several down-regulated genes included sequence homology for miR-221 sequence in their 3'UTR, allowing us to identify new potential miR-221 target genes. Pathways analysis performed on the genes identified by this approach revealed that miR-221 affected cell proliferation and apoptosis. Furthermore some miR-221 target genes from Sylamer results were investigated: RB1, WEE1 (cell cycle inhibitors), APAF1 (pro-apoptotic gene), ANXA1, CTCF (transcriptional repressor) were validated as miR-221 target genes, confirming the efficacy of Sylamer analysis and the ability of microRNA to promote HCC tumorigenesis by affecting these pathways.

To more directly demonstrate miR-221 oncogenic role, we created a transgenic mouse model of liver miR-221 overexpression. We proved the efficacy of this model by measuring miR-221 hepatic levels and protein expression of some miR-221 target genes (CDKN1B/p27, CDKN1C/p57, BMF), compared to wild type mice. We found that transgenic mice were prone to HCC development, since hepatic nodules were detectable in 50% of 9-12 months-old male animals. Treatment with DENA carcinogen allowed to speed tumor development and we found several liver tumors in 3 months-DENA-treated transgenic animals, while DENA-treated wild type mice developed hepatic cancer 2

months later. Tumors showed high miR-221 levels and low target proteins expression, meaning the microRNA was still present and active in cancer cells. Finally we demonstrated that anti-miR-221 injection in transgenic mice was able to reduce number and size of tumor nodules.

This study improved our knowledge about oncogenic role of miR-221 in HCC. In vitro studies and target genes validation allowed to better understand miR-221 molecular mechanisms that promote tumorigenesis. In vivo studies allowed to demonstrate an important role of miR-221 in HCC development and growth and provided evidence of efficacy of anti-miR-221 oligonucleotide in HCC treatment.

INTRODUZIONE

I microRNA: biogenesi e funzione

I microRNA costituiscono un'ampia classe di piccoli RNA non codificanti a singolo filamento, di lunghezza compresa tra 18-25 nucleotidi, coinvolti nella regolazione dell'espressione genica mediante meccanismi post-trascrizionali. Queste molecole riconoscono una porzione a loro complementare sul 3'utr (regione 3' non tradotta) dell'RNA messaggero dei loro geni bersaglio e ne inibiscono l'espressione, provocando la degradazione del mRNA o impedendone la traduzione in proteina.

Ad oggi si contano 18226 microRNA, registrati nel database miRBase (release 18, novembre 2011), di cui 1527 sono umani. Nell'uomo, i geni che codificano per queste molecole sono presenti su tutti i cromosomi, ad eccezione del cromosoma Y, e possono trovarsi in regioni introniche o in porzioni intergeniche, talvolta in regioni esoniche. Circa la metà dei geni codificanti microRNA è espresso come singolo gene, mentre l'altra metà è organizzata in *clusters*; microRNA appartenenti ad uno stesso *cluster* sono regolati dallo stesso promotore, perciò vengono espressi nelle stesse condizioni cellulari(1-3). La trascrizione dei geni codificanti per microRNA è mediata dall'RNA Polimerasi II e dà luogo a trascritti di RNA di lunghezza variabile, organizzati in strutture secondarie a forcina, detti *pri-miRNA*; queste molecole hanno il cap all'estremità 5' e la coda poliA all'estremità 3'. Il *pri-miRNA* è processato nel nucleo dal complesso enzimatico Drosha-DGCR8, fino ad ottenere delle molecole di RNA di circa 70 nucleotidi di lunghezza, dette *pre-miRNA*, aventi struttura a forcina con un'estremità protrudente di due nucleotidi al 3'; queste molecole vengono esportate dal nucleo al citoplasma grazie alla proteina esportina-5. Nel citoplasma, il complesso enzimatico Dicer-TRBP processa i *pre-miRNA* in molecole di RNA a doppio filamento di circa 22 nucleotidi. L'interazione del duplex con il complesso *RNA-induced silencing complex* (RISC) fa sì che una delle due molecole di RNA venga degradata, mentre l'altra viene mantenuta nel complesso e dà origine al microRNA maturo. Nella maggior parte dei casi, da un duplex di RNA, soltanto uno dei due filamenti dà origine al microRNA e l'altro è soggetto a degradazione, tuttavia in alcuni casi entrambi i filamenti possono dare origine a microRNA maturi; in questo caso i microRNA derivanti da due diversi filamenti dello stesso duplex vengono chiamati con lo stesso nome e distinti mediante il suffisso -5p o -3p(2).

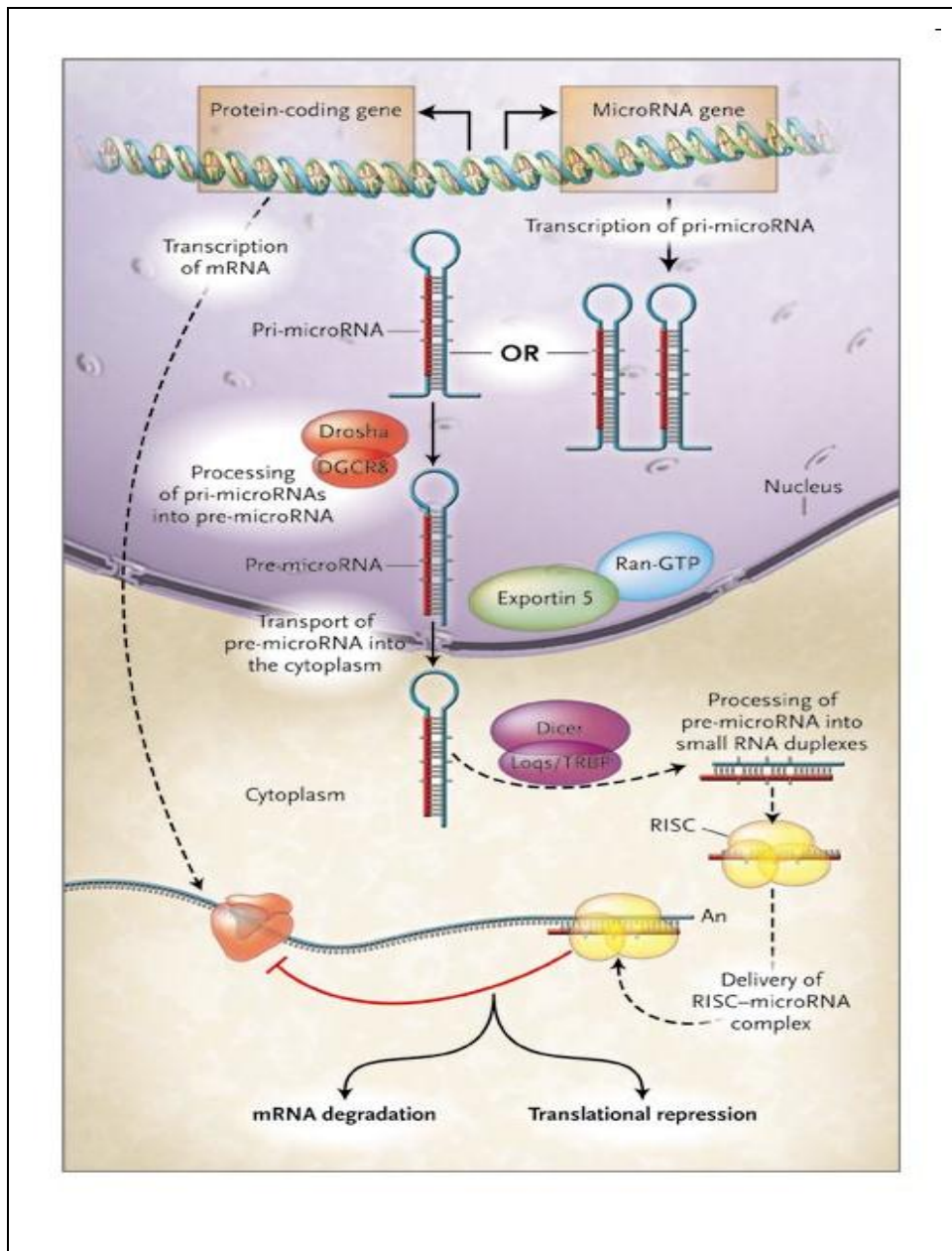


Figura 1. Rappresentazione schematica della biogenesi dei microRNA.

L'attività biologica del microRNA maturo, legato al complesso RISC, si esplica mediante il riconoscimento di sequenze ad esso complementari di solito presenti sulla porzione 3' non tradotta (3'utr) dell'RNA messaggero del gene bersaglio; l'interazione tra le due molecole provoca inibizione della traduzione o degradazione della molecola di mRNA. Il legame tra il microRNA e l'mRNA è mediato da una complementarietà imperfetta, tuttavia la porzione all'estremità 5' del microRNA, corrispondente ai nucleotidi 2-8 (talvolta anche 1-8) della molecola, appaia sempre con perfetta complementarietà all'mRNA bersaglio: questa porzione del microRNA viene detta *seed sequence*(4) ed è

responsabile dello specifico riconoscimento dei bersagli genici da parte del microRNA. Sul web sono disponibili svariati programmi di predizione dei geni bersaglio dei microRNA e questi algoritmi bioinformatici si basano proprio sulla ricerca delle sequenze complementari alle *seed sequences* dei microRNA sui 3'utr degli RNA messaggeri.

Nonostante siano state riconosciute condizioni in cui i microRNA sembrano indurre l'espressione dei loro geni bersaglio(5), tuttavia nella maggioranza dei casi finora studiati, queste molecole provocano inibizione dell'espressione dei loro bersagli genici. Se si considera che, in base a quanto calcolato mediante approcci bioinformatici, ogni microRNA può agire su un centinaio o più geni bersaglio(6) e che ogni gene cellulare viene regolato da moltissimi microRNA, si intuisce l'importante ruolo di queste molecole nella fine regolazione di tutti i processi fisiologici (sviluppo, differenziamento, proliferazione, apoptosi) e patologici della cellula.

MicroRNA e cancro

Il coinvolgimento dei microRNA nei tumori è noto solo da una decina di anni. La prima evidenza sperimentale risale al 2002, quando Calin e colleghi, studiando un'anomalia molto frequente nella leucemia linfatica cronica (CLL), la delezione al cromosoma 13q14, scoprirono che in questa regione erano presenti i geni codificanti per miR-15a e miR-16-1 e che questo locus genico rappresentava la più piccola regione di delezione nei casi di CLL affetti da questo tipo di anomalia genetica (presente in quasi il 70% dei casi totali di CLL)(7). Studi successivi dimostrarono che miR-15a e miR-16-1 avevano come bersaglio il gene BCL2, un noto oncogene con funzione anti-apoptotica; perciò nelle CLL, la perdita di espressione dei due microRNA, dovuta alla delezione del loro gene, provocava un aumento dell'espressione dell'oncogene BCL2, responsabile della sopravvivenza della cellula anche in presenza di segnali di morte cellulare(8), favorendo la trasformazione neoplastica. In seguito a questo studio, il numero dei lavori che descrivono il coinvolgimento dei microRNA nelle neoplasie umane è aumentato esponenzialmente nell'ultimo decennio.

È stato dimostrato che generalmente nelle neoplasie umane si ha una globale riduzione dei livelli totali di microRNA(9). In effetti, circa il 50% dei geni che li codificano si trova in regioni cromosomiche frequentemente soggette a mutazione nei tumori (detti siti

fragili)(10). I geni che codificano per microRNA possono essere soggetti agli stessi tipi di mutazioni che avvengono nei geni codificanti per proteine (mutazioni puntiformi, delezioni, amplificazioni), che ne possono inibire o favorire l'espressione. Inoltre possono essere regolati in maniera epigenetica, mediante metilazione del promotore (per esempio il miR-9-1 nel tumore mammario(11)). Accanto alle mutazioni, genetiche o epigenetiche, l'espressione dei microRNA può essere regolata anche indirettamente, mediante meccanismi di controllo trascrizionale; infatti la trascrizione dei microRNA è regolata da proteine, la cui espressione o funzione è frequentemente alterata nei tumori (per es. p53, c-MYC). Se nel processo di trasformazione tumorale l'espressione di un dato fattore trascrizionale viene indotta o inibita in modo anomalo, ciò comporta un'aberrante attivazione o inibizione della trascrizione di tutti i geni che questo fattore controlla, tra cui i geni dei microRNA. In questi casi l'espressione del microRNA può inserirsi in un meccanismo a *feedback positivo*, contribuendo a mantenere attiva la via di segnale responsabile della sua induzione, o in un meccanismo a *feedback negativo*, in grado di contrastarne l'attivazione. Un altro meccanismo indiretto di controllo dell'espressione dei microRNA riguarda l'insorgenza di mutazioni a carico dei geni codificanti per le proteine coinvolte nella biogenesi dei microRNA (tra cui DICER, DGCR8); per esempio, è stato dimostrato che la perdita di funzionalità di un allele codificante per DICER1, contribuiva ad una diminuzione globale dei livelli di microRNA cellulari e favoriva la trasformazione e la progressione neoplastica(12, 13).

Considerando che ogni microRNA può regolare anche cento o più geni bersaglio, risulta chiaro come l'aberrante espressione di un solo microRNA possa causare variazioni consistenti nell'espressione genica della cellula e quindi nelle sue vie di segnale. Nello sviluppo neoplastico, analogamente ai geni codificanti per proteine, i microRNA possono essere soggetti a mutazioni *gain of function*, se le mutazioni acquisite causano una sovra-espressione aberrante del gene o a *loss of function*, qualora venga inibita l'espressione o la normale funzione fisiologica del microRNA. Per questo motivo alcuni microRNA possono essere classificati come oncogeni o oncosoppressori, a seconda di come varia la loro espressione nelle neoplasie umane e della loro funzione nei processi cellulari, legata ai bersagli genici che regolano. Tra i microRNA più studiati con funzione di oncosoppressore, c'è per esempio il miR-145, che è stato ritrovato sotto-espresso in moltissimi tipi di neoplasie umane, tra cui il tumore alla mammella(14), al colon(15), al polmone(16), all'ovaio(17), alla prostata(18) e al fegato(19). A conferma di ciò, molti dei

geni bersaglio di questo microRNA sono oncogeni (per esempio c-MYC, FLI1, YES). Invece tra i principali microRNA con funzione oncogenica, detti anche oncomiR, c'è il miR-21, che è risultato significativamente sovra-espresso nel tumore alla mammella, all'ovaio, al fegato, al polmone, alla tiroide e nel glioblastoma; per questo microRNA sono stati indentificati diversi geni bersaglio che hanno funzioni di oncosoppressori(20) (21).

Tuttavia, accanto ai microRNA che si comportano da oncogeni o oncosoppressori nella maggioranza delle neoplasie umane, altri microRNA hanno espressione variabile a seconda del tipo di tumore. Lo studio di questi microRNA è comunque interessante in oncologia, se vengono considerati non come singole molecole, ma nell'insieme del "miRNoma", ossia l'espressione di tutti i microRNA della cellula. Ultimamente, con l'avvento e il miglioramento delle tecnologie di indagine "high-throughput", quali le piattaforme microarray, che permettono di indagare in un'unica analisi l'espressione di tutti i geni o di tutti i microRNA espressi da un campione, sta diventando pratica frequente la definizione del profilo di espressione dei microRNA di un determinato tipo tumorale. La generazione di questi profili-tessuto/tumore specifici, oltre ad apportare nuove molteplici informazioni utili per ampliare la conoscenza dei microRNA nella ricerca di base, si prestano anche per potenziali utilizzi clinici. Infatti lo studio del profilo di espressione dei microRNA può essere utilizzato per distinguere la neoplasia dal corrispondente tessuto sano o per distinguere neoplasie che differiscono per tipo, stadio, responsività a trattamenti terapeutici o altri parametri clinici (9) (22), suggerendo un possibile utilizzo di queste metodiche nella definizione della diagnosi e della prognosi di una patologia neoplastica.

Il profilo di espressione del "miRNoma" varia in modo tessuto-specifico, perciò una sua ulteriore applicazione clinica è legata all'identificazione del tumore d'origine di una metastasi a sede primitiva ignota(23). Inoltre negli ultimi anni si stanno diffondendo studi finalizzati a valutare l'utilizzo dei microRNA come marcatori sierici di patologia, che permetterebbero di effettuare diagnosi precoce di neoplasia, semplicemente analizzando il profilo di espressione dei microRNA presenti nel siero dei pazienti(24).

Dato che l'aberrante espressione dei microRNA è spesso coinvolta nei processi neoplastici, queste molecole costituiscono interessanti bersagli per la messa a punto di nuove terapie anti-tumorali. L'interesse nello studio di strategie terapeutiche che vadano

ad agire sui microRNA è legata al fatto che intervenendo terapeuticamente su un'unica molecola è possibile ottenere molteplici effetti sull'espressione genica della cellula, in quanto ogni microRNA regola moltissimi geni bersaglio. Due sono gli approcci in questo ambito: induzione di espressione di microRNA oncosoppressori; inibizione dell'espressione di oncomiRs. I microRNA con funzione di oncosoppressori, che generalmente sono sotto-espresi nei tumori, possono essere utilizzati come molecole terapeutiche per provocare morte delle cellule neoplastiche; per esempio è stato dimostrato che il miR-145 è in grado di indurre blocco proliferativo e morte in linee cellulari derivate da tumore mammario(25) e in un altro lavoro è stato dimostrato che la somministrazione sistemica di miR-26a in topo provocava inibizione della proliferazione tumorale di epatocarcinoma(26). Al contrario, per inibire l'espressione di oncomiRs si possono utilizzare molecole in grado di legare stabilmente il microRNA, sottraendolo alla sua funzione biologica: gli anti-miR (AMOs) sono oligonucleotidi ad RNA modificati chimicamente, aventi sequenza complementare al microRNA; gli antagomiRs hanno struttura simile, ma sono coniugati ad una molecola di colesterolo; gli LNA (Locked Nucleic Acid), sono oligonucleotidi ad RNA, in cui il ribosio è modificato sinteticamente mediante la creazione di un ponte che collega 2'O e 4'C; i vettori *sponge* (spugna) sono vettori plasmidici o virali, aventi la sequenza complementare al microRNA, ripetuta diverse volte. Queste molecole sono state già utilizzate in vitro e in vivo. Per esempio, è stato dimostrato che il blocco del miR-21, mediante la somministrazione in linee di glioblastoma di anti-miR-21, induceva un significativo aumento dell'apoptosi nelle cellule(27). In un altro esempio, la somministrazione intratumorale di anti-miR-150 in uno xenotrapianto di cellule derivate da carcinoma polmonare in topi nudi, ha provocato una diminuzione nelle dimensioni e nel peso della massa tumorale(28). Gli studi che sfruttano i microRNA come bersagli terapeutici in cancro restano ancora applicati soltanto a modelli in vitro o animali, ma, dati gli interessanti risultati ottenuti, in un prossimo futuro è plausibile che verranno testati anche clinicamente.

MicroRNA ed epatocarcinoma

L'epatocarcinoma è uno dei tumori più diffusi al mondo e costituisce la terza causa di morte per tumore, contando circa 600000 morti all'anno(29). Tra le cause favorevoli

l'insorgenza di questa patologia ci sono l'infezione da virus dell'epatite B (HBV) o C (HCV), l'abuso di alcol, l'esposizione ad aflatoxina B1, la cirrosi biliare primaria, il diabete e alcune patologie genetiche (per es. emocromatosi). Nell'80-90% dei casi l'epatocarcinoma si sviluppa come evoluzione della cirrosi epatica, nei restanti casi insorge in seguito a trasformazione neoplastica di un adenoma epatico(30). Dal punto di vista genetico, l'insorgenza e la progressione dell'epatocarcinoma sono legate alla deregolazione di molte vie di segnale intracellulari ed extracellulari: generalmente le prime mutazioni avvengono in geni coinvolti nei processi proliferativi ed apoptotici, mentre negli stadi più avanzati le cellule tumorali acquisiscono ulteriori anomalie genetiche che favoriscono i processi di angiogenesi, invasività e metastasi. Alcuni esempi di geni che risultano frequentemente deregolati nel tumore al fegato sono gli oncosoppressori RB1(31) e TP53(32), coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare e dell'apoptosi e gli oncogeni ciclina D1/CDK4(33), RAS(34), WNT/ β -catenina(35), PDGFR(36), coinvolti in vie di segnale pro-proliferative. Il gene VEGF è stato ritrovato sovra-espresso in epatocarcinoma e la mutazione a questo gene contribuisce ai processi angiogenetici e alla metastatizzazione (37). Se già da molti anni si studia il coinvolgimento di questi e altri geni nell'epatocarcinoma, tuttavia solo recentemente è emerso l'importante ruolo svolto dai microRNA nello sviluppo di questa patologia.

Numerosi sono i lavori che descrivono il coinvolgimento dei microRNA nella tumorigenesi epatica. Nella **tabella 1** sono elencati alcuni dei microRNA più studiati in questo tipo di tumore(38).

Tabella 1. MicroRNA coinvolti in epatocarcinoma

miRNA	Expression	Regulation	Target genes	Function	References
let-7	Down	ND	<i>c-Myc, Bcl-xL, COL1A2</i>	Grow (-), metastasis (-)	Ji et al (2010); Lan et al (2010); Shimizu et al (2010)
miR-1	Down	Methylation	<i>c-Met, FoxP1, HDAC4</i>	Grow (-), metastasis (-)	Datta et al (2008)
mir-17-5p	Up	ND	ND	Grow (+), metastasis (+)	Yang et al (2010a)
miR-101	Down	ND	<i>Mcl-1, FOS</i>	Grow (-), apoptosis (+), metastasis (-)	Su et al (2009); Li et al (2009b)
miR-106b-25	Up	ND	<i>p21, Bim</i>	Grow (+), apoptosis (-)	Li et al (2009c)
miR-122	Down	H1NF1A, H1NF3A, H1NF3B	<i>Cylin G1, SRF, Igf1R, Bcl-w, ADAM10, ADAM17</i>	Grow (-), metastasis (-), apoptosis (+)	Gramantieri et al (2007); Lin et al (2008); Bai et al (2009); Coulouarn et al (2009); Fornari et al (2009); Tsai et al (2009); Zhang et al (2009a); Ma et al (2010)
miR-124	Down	Methylation	<i>CDK6, VIM, SMYD3, IQGAP1</i>	Grow (-), metastasis (-) ^a	Furuta et al (2010)
miR-143	Up	NF-kB	<i>FNDC3B</i>	Metastasis (+)	Zhang et al (2009b)
miR-151	Up	Gain on 8q24.3	<i>RhoGDIA</i>	Metastasis (+)	Ding et al (2010)
miR-181b	Up	TGF-β	<i>TIMP3</i>	Metastasis (+)	Wang et al (2010)
miR-18a	Up	ND	<i>Erz</i>	Grow (+)	Liu et al (2009)
miR-195	Down	ND	<i>cydin D1, CDK6, E2F3</i>	Grow (-)	Xu et al (2009)
miR-199a-3p	Down	ND	<i>mTOR, c-Met</i>	Grow (-), metastasis (-)	Fornari et al (2010)
miR-203	Down	Methylation	<i>ABCE1</i>	Apoptosis (+)	Furuta et al (2010)
miR-21	Up	ND	<i>PTEN</i>	Grow (+), metastasis (+), apoptosis (-)	Meng et al (2007)
miR-221/222	Up	c-Jun	<i>p27, p57, DDIT4, PTEN, Bmf, TIMP3, PPP2R2A</i>	Grow (+), metastasis (+), apoptosis (-)	le Sage et al (2007); Fornari et al (2008); Garofalo et al (2009); Gramantieri et al (2009); Pineau et al (2010); Wong et al (2010)
miR-223	Down	ND	<i>Stathmin 1</i>	Grow (-)	Wong et al (2008)
miR-224	Up	ND	<i>APL5</i>	Grow (+), apoptosis (+)	Wang et al (2008)
miR-23b	Down	ND	<i>uPA, c-Met</i>	Metastasis (-)	Salvi et al (2009)
miR-26a	Down	ND	<i>Cylin D2, Cylin E2</i>	Grow (-)	Kota et al (2009)
miR-29	Down	ND	<i>Bcl-2, Mcl-1</i>	Apoptosis (+)	Xiong et al (2010)
miR-30d	Up	ND	<i>Gai2</i>	Metastasis (+)	Yao et al (2010)
miR-34a	Down	ND	<i>c-Met</i>	Metastasis (-)	Li et al (2009a)
miR-375	Down	ND	<i>YAP</i>	Grow (-), metastasis (-)	Liu et al (2010)
miR-602	Up	ND	<i>RASSF1A</i>	Grow (+), apoptosis (-)	Yang et al (2010b)

Abbreviations: (-) = inhibition; (+) = promotion; down = downregulated; ND = not determined; up = upregulated. ^ahypothesis.

Il microRNA maggiormente espresso nel fegato sano è il miR-122, la cui espressione da sola comprende più del 50% dell'espressione di tutti i microRNA epatici(39). Il miR-122 è stato ritrovato sotto-espresso in circa il 70% degli epatocarcinomi(40) e alcuni dei suo bersagli genici validati sono ciclina G1(41), gene coinvolto nella regolazione di p53, e Bcl-w, codificante per una proteina anti-apoptotica appartenente alla famiglia di Bcl2(42). La normale espressione di miR-122, mediante la regolazione di questi e altri bersagli genici, protegge la cellula dalla trasformazione tumorale. Uno studio recente ha dimostrato che analizzando i livelli sierici di miR-122 è possibile predire la presenza di epatocarcinoma nei pazienti, suggerendo un potenziale ruolo di questo microRNA come marcatore sierico di patologia epatica(43).

Le molecole appartenenti alla famiglia dei microRNA-199 (miR-199a/b-3p) occupano la terza posizione in ordine di espressione nel fegato sano e, insieme, costituiscono il 5% dell'espressione del miRNoma epatico(39). Nell'epatocarcinoma il miR-199a è stato ritrovato frequentemente sotto-espresso(39), ad indicare che questo microRNA svolge una funzione di oncosoppressore in questo tipo di neoplasia. A conferma di questo dato, alcuni suoi bersagli genici sono stati identificati: mTOR, coinvolto nella progressione del ciclo cellulare in fase G1-S, c-MET, un recettore tirosina-chinasi(44) e SMAD1(45), coinvolto in vie di trasduzione di segnale pro-proliferative, legate a recettori serina-

treonina-chinasi. Il miR-199a, inibendo l'espressione di queste molecole, svolge un'azione anti-proliferativa, perciò la sua perdita di espressione favorisce la proliferazione cellulare e quindi la trasformazione/progressione tumorale. È stato dimostrato che il ripristino dei livelli di miR-199a in modelli in vitro e in vivo di epatocarcinoma, provoca inibizione della crescita delle cellule tumorali(46).

Tra i principali oncomiR coinvolti in epatocarcinoma c'è miR-21, la cui espressione è ritrovata frequentemente aumentata nel tumore epatico rispetto al fegato sano (47). Due geni bersaglio di questo microRNA identificati in epatocarcinoma sono PTEN, che codifica per una fosfatasi, responsabile dell'inibizione di vie di segnale pro-proliferative(20) e Pcd4, gene pro-apoptotico(48). Il miR-21 è stato ritrovato sovra-espresso anche nel siero di pazienti affetti da epatite cronica o epatocarcinoma, pertanto questo microRNA potrebbe diventare un marcatore di patologia epatica(49, 50).

Un altro dei microRNA più studiati in epatocarcinoma è il miR-221, che verrà trattato in modo più approfondito nel paragrafo successivo.

Anche per i tumori epatici, sono stati effettuati diversi studi finalizzati a valutare il profilo di espressione globale dei microRNA in un elevato numero di neoplasie. Sono stati identificati specifici profili di espressione dei microRNA associati a eziologia tumorale, stadio, caratteristiche cliniche, probabilità di ricaduta e prognosi della patologia(51-54).

Lo studio dei microRNA nell'epatocarcinoma può essere di potenziale utilità clinica sia per identificare nuovi marcatori tissutali e sierici di patologia, sia al fine di identificare dei profili di espressione molecolare in grado di stratificare tumori con diverse caratteristiche e aggressività, utilizzabili come strumento diagnostico e prognostico. Tuttavia è necessario effettuare ancora diverse validazioni prima di poter effettivamente usufruire di questi studi in ambito clinico.

miR-221

Il gene codificante per il miR-221 si trova sul cromosoma X, sia nell'uomo, che nel topo e nel ratto e la sua sequenza è estremamente conservata filogeneticamente. Il miR-221 è espresso in tandem al miR-222 e i due microRNA hanno lo stessa *seed sequence*. Il miR-221 è uno dei microRNA più studiati nei tumori umani, in quanto è stato ritrovato sovra-espresso in moltissimi tipi di neoplasie, tra cui il glioblastoma(55), il carcinoma della vescica(56), il tumore papillare della tiroide(57), il tumore pancreatico(58), il carcinoma prostatico(59) e l'epatocarcinoma(60, 61). Sono già stati validati 32 bersagli genici del miR-221, elencati nella **tabella 4** (nel capitolo "Risultati"). Tra questi ci sono i geni CDKN1B/p27 e CDKN1C/p57(61), che codificano per due inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti, responsabili del controllo della transizione G1-S del ciclo cellulare. L'inibizione della loro espressione, dovuta alla sovra-espressione del miR-221, fa sì che vengano persi due importanti meccanismi regolatori della proliferazione cellulare, favorendo la crescita delle cellule neoplastiche. Altri due bersagli recentemente identificati sono BMF(62) in epatocarcinoma e BBC3/PUMA nel glioblastoma e nel tumore mammario e polmonare (63, 64). Entrambe queste proteine appartengono alla famiglia delle proteine definite *BH3-only*, in quanto possiedono un dominio BH3, che permette loro di interagire con altri membri della famiglia, in particolare con le proteine anti-apoptotiche Bcl2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, sottraendole alla loro azione e favorendo la formazione di pori nella membrana mitocondriale e il rilascio di ATP e citocromo C nel citoplasma, innescando la via intrinseca dell'apoptosi. Perciò, l'azione inibitoria del miR-221 su queste due proteine favorisce la sopravvivenza della cellula anche in presenza di stimoli pro-apoptotici. Il gene PTEN costituisce un altro bersaglio validato del miR-221 (65). Codifica per una lipid-fosfatasi che inibisce la via di segnale pro-proliferativa e anti-apoptotica di PI3K/AKT. Considerando i bersagli finora indicati si deduce che il miR-221 ha una funzione cellulare legata all'induzione della proliferazione cellulare e alla resistenza all'apoptosi. A conferma di ciò, studi effettuati in vitro, in linee cellulari derivate da diversi tipi di tumore umano (tra cui epatocarcinoma, carcinoma mammario, tumore al polmone, glioblastoma) hanno dimostrato che la sovra-espressione di questo microRNA provocava un aumento della proliferazione cellulare e una riduzione del tasso di morte cellulare, mentre al contrario, l'inibizione della sua attività mediante l'utilizzo di specifiche molecole anti-miR, provocava gli effetti opposti (61) (63) (64).

Quanto detto finora evidenzia l'importante ruolo del miR-221 nel favorire le prime fasi della trasformazione neoplastica, che sono di solito caratterizzate dall'insorgenza di mutazioni che conferiscono vantaggio proliferativo e resistenza all'apoptosi. Altri bersagli del miR-221 identificati recentemente sono PTP μ (55) e TIMP3 (65). PTP μ codifica per una tirosin-fosfatasi coinvolta nella regolazione di vie di segnale intra ed extracellulari e nelle adesioni cellula-cellula, TIMP3 appartiene alla famiglia degli inibitori tissutali delle metalloproteinasi, pertanto l'inibizione dell'espressione di queste due proteine ad opera del miR-221 favorisce i processi di invasione e metastasi, che sono caratteristici degli stadi più avanzati della progressione tumorale. Quindi la sovra-espressione del miR-221 è coinvolta in tutte le fasi dell'evoluzione neoplastica. A conferma di ciò, è stato dimostrato che l'espressione di questo microRNA aumenta non solo nella condizione tumorale, rispetto al corrispondente tessuto sano, ma correla anche con l'aggressività della patologia: aumentati livelli di miR-221 sono associati a multifocalità del tumore, metastasi, resistenza a trattamenti terapeutici e/o ridotto tempo libero da malattia in diversi tipi di neoplasie epiteliali(62, 66). Perciò il microRNA-221 si propone come un nuovo promettente marcatore di patologia tumorale e indicatore prognostico in molte tipologie di tumori umani.

Inoltre recenti scoperte hanno ritrovato elevati livelli di questo microRNA nel siero di pazienti affetti da epatocarcinoma(67), tumore la polmone(68), melanoma maligno(69), tumore al colon(70), individuando un potenziale ruolo di questa molecola come marcatore sierico per effettuare diagnosi precoce di patologia neoplastica.

Dato l'importante coinvolgimento del miR-221 in un elevato numero di tumori epiteliali, questo microRNA è considerato un interessante bersaglio terapeutico. Diversi studi effettuati in vitro su diversi tipi di linee cellulari hanno dimostrato l'efficacia di molecole anti-miR-221 nel ridurre i livelli di miR-221, diminuire il tasso di proliferazione e indurre apoptosi (60) (63) (64). Il blocco dell'azione del miR-221 è stato testato anche in vivo ed è stato dimostrato che l'utilizzo di anti-miR-221 inibisce la crescita cellulare di xenotrapianti prostatici ed epatici in topi(59, 71).

Scopo del lavoro

In questi ultimi anni svariati studi hanno dimostrato il coinvolgimento dell'aberrante espressione del miR-221 nei tumori umani. L'identificazione di alcuni suoi bersagli genici ha apportato un notevole contributo per delineare il ruolo patologico di questo microRNA. Tuttavia le nostre conoscenze sul suo meccanismo d'azione, in particolare nella tumorigenesi, e sulla possibilità clinica di contrastare la sua attività oncogenica, necessitano di ulteriori studi.

Questo lavoro si è focalizzato sullo studio dell'attività oncogenica del miR-221 nella tumorigenesi epatica. Per meglio comprendere il suo ruolo nell'insorgenza tumorale, sono stati ricercati nuovi bersagli genici del microRNA. I geni candidati per questo studio, identificati mediante un approccio bioinformatico innovativo, appartenevano a vie di segnale cellulari alterate dalla sovra-espressione del microRNA in una linea cellulare di epatocarcinoma. Questo approccio ha consentito di individuare nuovi bersagli genici del miR-221, già noti per il loro coinvolgimento nei tumori umani come geni oncosoppressori.

Le evidenze sperimentali *in vitro* confermano l'importante ruolo del miR-221 nella tumorigenesi epatica. Allo scopo di studiare gli effetti della sovra-espressione epatica di questo microRNA, è stato creato un topo transgenico che sovra-esprimeva miR-221 nel fegato. Questo modello animale ha consentito inoltre di testare l'efficacia anti-tumorale di molecole anti-miR-221.

MATERIALI E METODI

Campioni clinici epatici

I campioni clinici epatici sono stati ottenuti da pazienti sottoposti a chirurgia epatica presso il Dipartimento di Medicina Interna dell'Università di Bologna, dopo aver chiesto il consenso informato. Subito dopo l'asportazione chirurgica i tessuti sono stati immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a -80°C. Al momento dell'utilizzo i tessuti sono stati risospesi in Trizol (Invitrogen) ed estratti, seguendo il protocollo indicato dalla ditta.

Linee cellulari e transfezioni

Gli esperimenti in vitro sono stati effettuati su cellule SNU-398 e HepG2 derivate da epatocarcinoma umano, HEK293, derivate da fibroblasti embrionali renali umani, H460, derivate da carcinoma polmonare umano e NIH3T3, di fibroblasti embrionali di topo, acquisite presso l'American Type Culture Collection (Manassas, VA). Le linee cellulari sono state mantenute in terreno IMDM (Iscove Modified Dulbecco's Medium), supplementate con 10% di siero fetale bovino inattivato (Sigma-Aldrich) e 0,1% di gentamicina (Sigma-Aldrich). Le cellule da transfettare sono state seminate ad una appropriata densità in piastre da 24 pozzetti, in 500 µl di terreno IMDM, addizionato di siero fetale bovino 10%, privo di antibiotico. Dopo 24 ore ogni pozzetto è stato transfettato in triplicato mediante Lipofectamine2000 (Invitrogen), utilizzando il terreno da transfezione Optimem (Invitrogen-Gibco) in accordo con le indicazioni delle ditte. Il precursore del miR-221 (hsa-miR-221) e il controllo negativo NC2 sono stati acquistati da Applied Biosystems/Ambion. L'oligonucleotide anti-miR-221 è stato sintetizzato da Integrated DNA Technology (IDT) e ha la seguente sequenza:

5'-

mG*mA*mAmAmCmCmCmAmGmCmAmGmAmCmAmAmUmGmU*mA*mG*mC*
mU-3'

m = nucleotide metilato

* = legame fosforotioato

RT-PCR e Real Time per valutare l'espressione del miR-221

Gli RNA sono stati estratti dai lisati cellulari o dai tessuti epatici omogeneizzati, risospesi in Trizol (Invitrogen), secondo le indicazioni della ditta. Per effettuare la RT-PCR miR-specifica è stato utilizzato il protocollo e i reagenti del *TaqMan® Micro RNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystem), partendo da 10 ng di RNA totale. I primers usati per retrotrascrivere i microRNA umano e murini sono stati forniti dai kit *TaqMan MicroRNA Assays* - hsa-miR-221, mmu-miR-221, mmu-miR-21, mmu-miR-122, mmu-miR-199 (Applied Biosystem).

I cDNA specifici per ogni microRNA stati utilizzati come templati delle reazioni di PCR Real-time. Per effettuare questa reazione sono stati utilizzati primers e sonde forniti dai rispettivi kit *TaqMan MicroRNA Assays* (Applied Biosystem); ogni campione è stato analizzato in triplicato. L'analisi dei dati ottenuti è stata effettuata mediante il software *Genex* (Biorad), che sfrutta il metodo del $\Delta\Delta Ct$ per calcolare il livello di espressione relativo del microRNA in ogni campione, sulla base del ciclo soglia (Ct) a cui viene rilevata la fluorescenza. I valori di espressione del miR-221 umano sono stati normalizzati sull'espressione del gene 18S, per ogni campione, mentre l'espressione dei microRNA di topo è stata normalizzata sull'espressione di snoRNA412 (primers e sonda sono stati forniti dal kit *TaqMan MicroRNA Assays snoRNA412* – Applied Biosystem).

Per misurare la quantità di miR-221 presente in circolo nei topi transgenici, è stato ottenuto il plasma dal sangue degli animali. Ai campioni di plasma è stata aggiunta la molecola sintetica cel-miR-39 alla concentrazione finale di 62,5 pM, prima di essere congelati a -80°C. L'estrazione dell'RNA è stata effettuata secondo il protocollo previsto dal reagente Trizol (Invitrogen). I livelli di mmu-miR-221 e cel-miR-39 sono stati analizzati in ogni campione mediante *TaqMan MicroRNA Assays* - mmu-miR-221 e cel-miR-39 (Applied Biosystem), come descritto sopra. I livelli di espressione del miR-221 sono stati normalizzati su quelli di cel-miR-39. Insieme ai campioni, un oligonucleotide avente la sequenza del miR-221 maturo (5'- AGCTACATTGTCTGCTGGGTTTC-3') è stato analizzato a diverse diluzioni mediante PCR Real Time, per generare una curva standard che ha permesso di quantificare il miR-221 presente nel plasma dei topi transgenici.

Analisi mediante Sylamer

Gli RNA ottenuti da tre replicati sperimentali di cellule SNU-398 transfettate con miR-221 e quattro campioni di controllo, transfettati con NC2, sono stati analizzati mediante piattaforma microarray per valutare l'espressione genica (Agilent Whole Human Genome Oligo Microarrays – Agilent Technologies), seguendo il protocollo indicato dalla ditta e citato in un precedente articolo(72). I risultati sono stati analizzati mediante il software GeneSpring GX versione 11 (Agilent Technologies) e opportunamente filtrati in modo da escludere i segnali che non si distinguevano dal rumore di fondo. Per ogni gene è stata calcolata la media di espressione nei due gruppi di campioni ed è stato calcolato il fold change rapportando le medie di espressione nei due gruppi (in caso di fold change compreso tra 0 e 1, è stato assegnato un valore corrispondente all'inverso del reciproco). I geni sono stati ordinati in base a fold change crescente (da quelli meno espressi nelle cellule transfettate con miR-221 rispetto al controllo, a quelli più espressi) e forniti come input al programma Sylamer (EMBL-EBI), attraverso l'interfaccia web Sylarray (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/sylarray>), per identificare la presenza di significativi arricchimenti di sequenze bersaglio dei microRNA nella lista di geni. Dall'analisi sono stati ricavati quattro grafici, corrispondenti a quattro possibili diverse sequenze complementari alla *seed* del miR-221: TGTAGC (nucleotidi 2-7 della molecola del microRNA), TGTAGCA (nucleotidi 2-8), ATGTAGC (nucleotidi 1-7), ATGTAGCA (nucleotidi 1-8). La soglia è stata scelta considerando il primo picco che si trovava in corrispondenza del fold change più basso, nei quattro grafici. Tutti i geni compresi entro questa soglia sono stati inclusi nelle successive analisi. Gli algoritmi di predizione usati per identificare i geni bersaglio del miR-221 sono TargetScan versione 5.2, MicroCosm versione 5, Diana MicroT versione 3.

Preparazione dei cloni stabili di cellule SNU-398 sovra-espressanti miR-221

Cellule SNU-398 sono state transfettate con il plasmide pMIF-GFP-miR-221, un vettore di espressione eucariotico contenente il gene per la resistenza all'antibiotico zeocina, in cui è stato clonato il gene codificante per miR-221, utilizzando il sito di restrizione NheI. Dopo 24 ore le cellule sono state diluite e mantenute in coltura in terreno IMDM,

aggiunto di siero fetale bovino (10%), gentamicina (0,1%) e antibiotico zeocina 400 µg/ml. Dopo quattro settimane i cloni di cellule formati sono stati raccolti e mantenuti in coltura separatamente, in terreno addizionato di zeocina 400 µg/ml. Dai cloni è stato estratto l'RNA, ed è stato quantificato il livello di espressione del miR-221, mediante PCR Real Time.

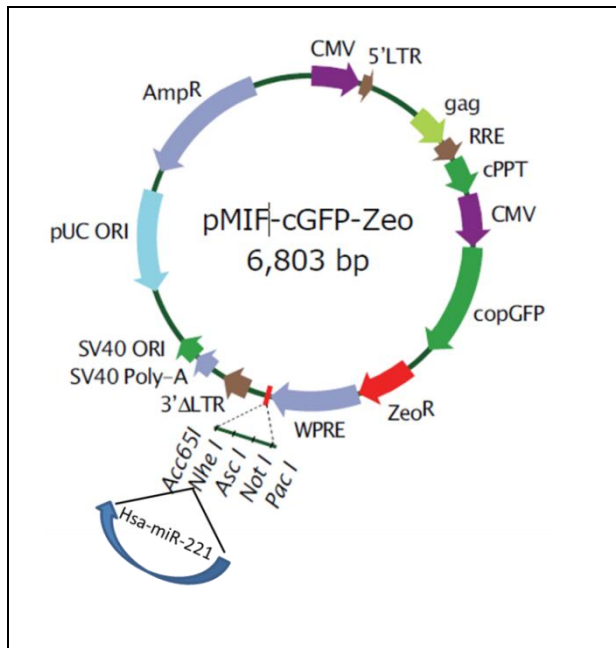


Figura 2. pMIF-cGFP-Zeo-miR-221. Rappresentazione schematica del costrutto usato per la preparazione dei cloni stabili sovra-esprimenti miR-221. Nel vettore è stato clonato il gene codificante per il miR-221 umano, usando il sito di restrizione NheI. Il plasmide contiene il gene che conferisce resistenza all'antibiotico zeocina, usato per favorire la sopravvivenza delle cellule che erano in grado di esprimere i transgeni contenuti nel plasmide.

Studio delle vie di segnale indotte dal miR-221

L'analisi delle vie cellulari in cui erano coinvolti i geni identificati mediante Sylamer è stata effettuata mediante un apposito algoritmo, incluso nel software GeneSpring GX versione 11 (Agilent Technologies), che permette di categorizzare un elevato numero di geni in gruppi coinvolti nella stessa funzione biologica cellulare. La significatività di ogni via cellulare identificata è stata calcolata dal programma mediante il test T di Student, considerando un valore soglia pari a 0,05.

Gli esperimenti per valutare le vie di segnale indotte dal miR-221 nelle cellule SNU-398 wild type e sovra-esprimenti miR-221, sono stati effettuati mediante il kit Signal Finder Cancer 10-Pathway Reporter Array (SABiosciences), seguendo le indicazioni della ditta. Per validare i risultati ottenuti, sono stati effettuati saggi di attività luciferasica utilizzando costrutti luciferasici responsivi a determinati fattori di trascrizione. I plasmidi pRB-TA-LUC, pE2F-TA-LUC, pMYC-TA-LUC (Mercury Pathway Profiling System, Clontech) e

pNFkB-LUC (Clontech) contengono il gene reporter codificante per la luciferasi di lucciola sotto il controllo di un promotore contenente la sequenza riconosciuta dallo specifico fattore di trascrizione. Come rispettivi controlli negativi sono stati utilizzati i plasmidi pTA-LUC (Mercury Pathway Profiling System, Clontech) e pTAL-LUC (Clontech), il cui promotore è composto dalla sequenza TATA del gene della timidina chinasi del Virus Herpes Simplex. Il plasmide pGL3-OT contiene, a monte del gene della luciferasi, 3 copie del sito di legame di Tcf-4, un fattore di trascrizione che interagisce con β -catenina per attivare l'espressione dei suoi geni a valle, mentre il suo controllo negativo pGL3-OF contiene nel suo promotore 3 copie del sito di legame mutato di Tcf-4. Questi costrutti sono stati usati in precedenza⁽⁷³⁾ e sono stati forniti da Bert Volgstein.

Le cellule sono state seminate in piastre da 24 pozzetti, alla densità di 10^5 cellule per pozzetto. Dopo 24 ore ogni pozzetto è stato transfettato in triplicato con 400 ng del rispettivo plasmide, 40 ng di costrutto pRL-TK (Promega), codificante per la luciferasi di renilla e, dove necessario, 50 pmoli di oligonucleotide anti-miR-221. Dopo 24 ore sono stati raccolti i lisati da ogni pozzetto ed è stato effettuato il saggio di attività luciferasica mediante il kit Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). La valutazione dell'attività luciferasica relativa è stata calcolata dividendo il valore della luminescenza di lucciola per quella di renilla, per ogni campione. Al valore di attività luciferasica relativa di ogni campione è stato sottratto il valore del controllo negativo corrispondente (cellule transfettate con pTA-LUC, pTAL-LUC o pGL3-OF).

RT-PCR e Real Time per valutare l'espressione genica, mediante EvaGreen

Le cellule sono state transfettate con 50 pmoli/pozzetto di miR-221 o NC2, nelle stesse condizioni descritte precedentemente. Dopo 48 ore dalla transfezione sono stati raccolti i lisati cellulari e risospesi in Trizol (Invitrogen). Gli RNA sono stati estratti seguendo le indicazioni della ditta. La retrotrascrizione è stata effettuata su 500 ng di RNA totale, mediante l'utilizzo di *random examers* e oligodT, che ha permesso di ottenere un pool di cDNA corrispondenti a tutti gli mRNA cellulari. Le condizioni di retrotrascrizione usate sono le seguenti: 37°C 1 ora, 94°C 5 minuti. I cDNA, opportunamente diluiti (1:5 per ANXA1, 1:10000 per 18S, 1:100 per tutti restanti geni), sono stati utilizzati come

templati della reazione di PCR Real Time e sono stati analizzati in triplicato. I primers utilizzati per amplificare i diversi geni sono elencati nella **tabella 2**. Oltre ai geni considerati, sono stati analizzati anche gli mRNA dei geni 18S e GAPDH, usati come normalizzatori sperimentali. La PCR quantitativa è stata effettuata mediante l'aggiunta del colorante fluorogenico Evagreen (Biotium) alla mix di reazione (usato nelle condizioni indicate dalla ditta), che ha permesso di monitorare la quantità di DNA presente in ogni campione nel corso dei cicli di amplificazione. Per la reazione di PCR quantitativa è stato usato il seguente programma: 95°C 15 minuti, 95°C 30 secondi e 58°C 30 secondi per 40 cicli. L'analisi dei dati ottenuti è stata effettuata mediante il software *Genex* (Biorad), che sfrutta il metodo del $\Delta\Delta C_t$ per calcolare il livello di espressione relativo del gene in ogni campione, sulla base del ciclo soglia (C_t) a cui viene rilevata la fluorescenza, normalizzando sull'espressione di un gene di riferimento (in questo caso sono stati usati GAPDH e 18S come geni di riferimento).

Tabella 2. Primers utilizzati nelle reazioni di PCR Real Time

Primer	Sequenza
RB1_2612F	TCAGAAGGTCTGCCAACACCAACA
RB1_2744R	TGAGCACACGGTCGCTGTTACATA
APAF1_1046F	GGCTGTGGGAAGTCTGTATTAG
APAF1_1195R	CAACCGTGTGCAAAGATTCTG
ANXA1_835F	TGGAGTTGAAAGGTGACATTG
ANXA1_982R	CGGGAAACCATAATCCTGATC
WEE1_1994F	CGAATAGAATTGAATGCCGAAAAG
WEE1_2142R	GATGTTCTATTACTCTGGGTGG
CTCF_1499F	AGTGTTCATGTGCGATTAC
CTCF_1654R	GGGTTCTCATGTGCCTTTTC
GAPDH_1107F	CTATAAATTGAGCCCCGAGCC
GAPDH_1257R	CCCAATACGACCAAATCCGT
18S_616F	AGCAGCCGCGGTAATTCCAGCT
18S_784R	CGGGACACTCAGCTAAGAGCATC

Preparazione dei costrutti luciferasici su vettore psiCHECK.2

Al fine di verificare l'interazione tra il miR-221 e le sequenze ad esso complementari, presenti sul 3'UTR dei geni in esame, sono stati preparati dei costrutti luciferasici, contenenti le porzioni geniche in esame clonate a valle del gene codificante per la luciferasi di renilla, nel plasmide psiCHECK-2 (Promega). Questo plasmide è stato scelto

in quanto, oltre al gene della luciferasi di renilla, contiene al suo interno anche quello codificante per la luciferasi di lucciola, necessario come normalizzatore. Le porzioni del 3'UTR dei geni in esame sono state amplificate mediante PCR, usando i primers elencati nella **tabella 3**, aventi il sito di taglio degli enzimi di restrizione corrispondenti nella loro estremità 5' (XhoI, nel primer *forward* F, PmeI, nel primer *reverse* R, evidenziati in blu e verde nella sequenza). Gli amplificati e il vettore psiCHECK-2 sono stati digeriti con i due enzimi e ligati. I costrutti ottenuti sono stati chiamati *psiCHECK-RB1-3'utr*, *psiCHECK-APAF1-3'utr*, *psiCHECK-ANXA1-3'utr*, *psiCHECK-WEE1-3'utr*, *psiCHECK-CTCF-3'utr* e *psiCHECK-FASLG-3'utr*. Il costrutto *psiCHECK-RB1-3'utr* è stato mutagenizzato (la mutagenesi è stata effettuata dalla ditta Genescript), creando delezioni di 6 nucleotidi nelle due sequenze complementari al miR-221. Il plasmide così ottenuto è stato chiamato *psiCHECK-RB1-3'utr mutato*. Le sequenze di tutti i costrutti sono state verificate mediante sequenziamento.

Tabella 3. Primers utilizzati per amplificare le porzioni di 3'UTR dei geni in esame, da clonare in psiCHECK.

Nome primer	Sequenza	Temperatura di appaiamento (°C)	Lunghezza a 3'UTR clonato (pb)
RB1_2955F	CTCGAGGATCTCAGGACCTTGGTGGA	58	1030
RB1_3984R	GTTTAAACCCAAATTAAGGAGGGCAGAA	58	
APAF1_4177F	CTCGAGGTGGTGGAAACGTTGTCCTG	59	762
APAF1_4938R	GTTTAAACCCCTGGCAACAAAGCAAGACT	59	
ANXA1_1115F	CTCGAGAACATTCCCTTGATGGTCTCA	60	281
ANXA1_1395R	GTTTAAACTGTGACGTCATTTTATTTTCAGC	60	
WEE1_2160F	CTCGAGAGGACTCGGCCTTTCAAGA	60	839
WEE1_2998R	GTTTAAACCATCCATCCAGCCTCTTCAC	60	
CTCF_2922F	CTCGAGCCTCCCTCCATGTGGTAAAC	59	972
CTCF_3893R	GTTTAAACTAGATCCTCCTCCCCAGCTT	59	
FASLG_1043F	CTCGAGTACAGGCACCGAGAATGTTG	59	660
FASLG_1702R	GTTTAAACTTGACCAAATGCAACCCATA	59	

Saggio di attività luciferasica per valutare l'interazione tra miR-221 e le sequenze ad esso complementari sul 3'UTR dei geni in esame

Per effettuare il saggio luciferasico le cellule HEK-293, SNU-398, HepG2 sono state seminate in piastre da 24 pozzetti, alla densità di 10^5 cellule/pozzetto. Dopo 24 ore ogni pozzetto è stato transfettato in triplicato con 400 ng di plasmide luciferasico e 50 pmoli di precursore del miR-221, NC2 (Applied Biosystems/Ambion) o di anti-miR-221. Il plasmide psiCHECK-2 vuoto è stato utilizzato come controllo negativo. Dopo 24 ore sono stati raccolti i lisati da ogni pozzetto ed è stato effettuato il saggio di attività luciferasica mediante il kit Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). La valutazione dell'attività luciferasica relativa è stata calcolata dividendo il valore della luminescenza di renilla per quella di lucciola, per ogni campione.

Western Blot

Le cellule sono state transfettate in quadruplicati con 50 pmoli/pozzetto di miR-221, NC2 o anti-miR-221, nelle stesse condizioni descritte precedentemente. Dopo 48 ore dalla transfezione le cellule sono state lisate, raccolte effettuando *pool* dei quadruplicati, e risospese in tampone RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay) (Sigma-Aldrich), completato con cocktail di inibitori delle proteasi (Protease inhibitors - Sigma-Aldrich), secondo le indicazioni della ditta.

I tessuti epatici dei topi sono stati congelati in azoto liquido subito dopo il prelievo e conservati a -80°C , fino al momento dell'utilizzo. L'estrazione delle proteine da questi campioni è stata effettuata come precedentemente descritto(62).

Per quantificare i campioni proteici è stato adottato il metodo di Bradford. La procedura del Western Blot è stata eseguita come già descritto in precedenza(41). Le proteine corrispondenti ai geni in analisi sono state identificate mediante i seguenti anticorpi:

- Anti-human Retinoblastoma Protein (RB) prodotto in topo, 554136 - BD Biosciences, diluizione 1:250
- Anti APAF1 prodotto in coniglio, clone E38 (Millipore), diluizione 1:1000

- Anti-ANXA1 prodotto in coniglio, sc-11387 (Sancta Cruz Biotechnology), diluizione 1:500
- Anti-WEE1 prodotto in coniglio, (Sancta Cruz Biotechnology), diluizione 1:500
- Anti-Bmf prodotto in coniglio (Novus Biologicals), diluizione 1:500
- Anti-p57/Kip2 prodotto in coniglio, clone EP2515Y (Epitomics), diluizione 1:1000
- Anti-p27/Kip1 prodotto in coniglio, clone EPFHCR16 (Epitomics), diluizione 1:2000
- Monoclonal anti-actin prodotto in topo, A4700 (Sigma-Aldrich), diluizione 1:1000
- Anti- β -tubulin, prodotto in coniglio, sc-9104 (Sancta Cruz Biotechnology), diluizione 1:1000

Come anticorpi secondari sono stati utilizzati:

- anticorpo anti-mouse, coniugato con perossidasi di rafano (HRP) - A9044 (Sigma), diluizione 1:20000
- anticorpo anti-rabbit, coniugato con perossidasi di rafano (HRP) - 7074 - (Cell Signaling), diluizione 1:40000

Per lo sviluppo del segnale chemiluminescente è stato utilizzato: LiteAblot Turbo Extra-Sensitive Chemiluminescent Substrate (Euroclone). Il segnale chemiluminescente è stato impressionato su lastre fotografiche (Kodak). Le bande relative alle proteine identificate sono state quantificate mediante il software ImageJ e l'espressione di ogni proteina è stata normalizzata sull'espressione della β -actina o della β -tubulina del campione corrispondente.

Saggio di attività luciferasica per valutare l'efficacia del promotore EII- α 1AT

Cellule HepG2, H460 e NIH3T3 sono state seminate in piastre da 24 pozzetti. Dopo 24 ore i pozzetti sono stati transfettati in triplicato con 400 ng/pozzetto di costrutti pGL3-EII- α 1AT o pGL3 e 40 ng/pozzetto di vettore pRL-TK (Promega). Dopo 24 ore dalla transfezione l'attività luciferasica di lucciola e renilla sono state valutate mediante il kit Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega). L'attività luciferasica relativa è stata calcolata dividendo il valore dell'attività luciferasica di lucciola per quella di renilla, per ogni campione.

Costruzione del plasmide pWhere-EII- α 1AT-miR221

Il plasmide pWhere-EII- α 1AT-miR221 è stato costruito al fine di indurre l'espressione del miR-221 nel fegato dei topi. Il promotore chimerico EII- α 1AT è stato amplificato mediante PCR dal plasmide pGL3-EII- α 1AT, usando i primers EII33_XhoI_Fwd (5'-CTCGAGCCCTATATATGGATCCGC-3') e EII512_SmaI_Rev (5'-CCCGGGTTCAGTGTCCAGGTCA-3'), contenenti le sequenze riconosciute dagli enzimi di restrizione XhoI e SmaI nella loro estremità 5' (evidenziate in blu e rosso). Il prodotto è stato clonato nel vettore pWhere (Invivogen), usando i siti di restrizione XhoI e SmaI. Il gene codificante per mmu-miR-221 è stato amplificato da DNA genomico murino mediante PCR usando i primers miR221_18SmaI_Fwd (5'-CCCGGGCCAGAGTTTGATGAAGGATGAAG-3') e miR221_836NcoI_Rev (5'-CCATGGGAGGGACAGAAACAGACCA-3') ed è stato clonato nel vettore pWhere, a valle della sequenza promotoriale, mediante i siti di restrizione SmaI e NcoI (le cui sequenze di restrizione, incluse nei primers, sono evidenziate in rosso e giallo). Il plasmide finale è stato sequenziato per verificarne la sequenza.

Produzione del topo transgenico sovra-esprimente miR-221

Il topo transgenico è stato sviluppato dal "Transgenic and Gene Targeting Facility" del Kimmel Cancer Center (Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA). Brevemente, per generare un ceppo di topi transgenici, 10 μ g di vettore pWhere-EII- α 1AT-miR221 sono stati linearizzati mediante l'enzima di restrizione PacI. Il frammento purificato di 9kb contenente il transgene è stato microiniettato in ovociti fertilizzati di un ceppo di topi B6D2F2, ottenuto da un incrocio tra animali B6D2F1 (C57BL6/J x DBA/2J); gli ovociti sono stati impiantati in un topo femmina per favorire il completamento del loro sviluppo. Per identificare i potenziali portatori sono state effettuate delle analisi PCR sul DNA genomico prelevato dalla coda dei topi neonati: i campioni, derivati da biopsie di coda di circa 2 mm di diametro, sono stati incubati per 16 ore a 56° C in tampone di lisi (Tris-HCl 50 mM, EDTA pH=8 100mM, NaCl 100mM, SDS 1%) con proteinasi K (20 μ g/ml, Invitrogen). Il DNA genomico è stato estratto dai tessuti lisati mediante un protocollo standard di estrazione fenolo-cloroformio ed è stato precipitato con Sodio Acetato 0,3M pH=4.8 e Etanolo 100% e risospeso in tampone TE. Per valutare la presenza del transgene

è stata effettuata una PCR su 25 ng di DNA genomico, mediante i primers $\alpha 1AT_Fwd$ (5'-AATACGGACGAGGACAGGG-3') e $miR221_836Rev$ (5'-GGAGGGACAGAAACAGACCA-3'). Molti topi transgenici sono stati identificati. Un incrocio con il topo wild type B6D2 ha permesso di dimostrare la trasmissione del transgene e stabilire 9 linee F1 eterozigoti. Per generare topi transgenici sovraespressanti miR-221 nel fegato in omozigosi abbiamo prima valutato il livello di espressione del miR-221 nel fegato degli animali transgenici della progenie F1, mediante PCR Real Time. L'analisi dell'espressione del miR-221 nel fegato ha rivelato che i topi derivati da 2 *founders* mostravano un aumento 10 volte maggiore rispetto al controllo non transgenico, mentre gli altri non mostravano differenze di espressione rispetto ai topi wild-type B6D2. Gli animali di F1 sovraespressanti il miR-221 sono stati incrociati tra loro in modo da ottenere una progenie F2. Per identificare i potenziali topi omozigoti è stata effettuata una PCR Real Time sul DNA estratto dalle code, per valutare il numero di copie del transgene. Gli animali con il più alto numero di copie del transgene sono stati incrociati con un topo wild type per confermare la loro effettiva condizione omozigote. Infine una progenie omozigote F3 di topi transgenici è stata prodotta incrociando tra loro i topi omozigoti identificati.

Studi in vivo

Le sperimentazioni animali hanno ricevuto l'approvazione del comitato etico. Gli animali sono stati mantenuti in un armadio ventilato a una temperatura costante di 25°C, con cicli di 12 ore di luce-buio. I topi a 10 giorni di età sono stati trattati con DENA (Sigma-Aldrich), 7,5 mg/kg, mediante iniezione intra-peritoneale(74) e sacrificati a 6 o 9 mesi di età. Tutti i topi e i fegati prelevati sono stati pesati. Gli animali sono stati sottoposti ad autopsia e tutti i tessuti sono stati divisi in due parti, di cui una fissata in formalina 10%, l'altra congelata in azoto liquido.

Per valutare l'efficacia del trattamento con anti-miR-221, i topi sono stati trattati con una singola dose intravenosa di 350 μg (10 mg/kg) di oligonucleotide, diluito in soluzione salina. Tutti gli animali sono stati sacrificati dopo 48 ore e sono stati prelevati sangue e tessuti epatici, per le analisi molecolari.

Per valutare l'attività antitumorale del trattamento con anti-miR-221 i topi dopo 10 giorni dalla nascita hanno ricevuto un'iniezione intraperitoneale di DENA (7,5 mg/kg) e dopo 2 mesi sono stati trattati con anti-miR-221 (10 mg/kg), diluita in soluzione salina, mediante iniezione intravenosa, effettuata in 3 diverse somministrazioni, a 15 giorni di distanza l'una dall'altra (per un totale di circa 1 mg di oligonucleotide/topo). I topi sono stati sacrificati a 4 o 5 mesi di età.

Analisi immunostochimiche

La presenza e localizzazione della proteina p27 nei tessuti di fegato dei topi transgenici e dei controlli è stata determinata mediante reazione immunostochimica, effettuata presso il reparto di Anatomia Patologica dell'Ospedale di Bologna. Brevemente, i tessuti epatici dei topi sono stati fissati in formalina, inclusi in paraffina e tagliati, in modo da ottenere sezioni di 4 µm di spessore. Dopo la reidratazione, l'inibizione delle perossidasi endogene è stata ottenuta mediante l'incubazione delle fettine di tessuto in 1% H₂O₂-metanolo per 20 minuti a 4°C. Le fettine sono state sottoposte a un pre-trattamento in una soluzione di tampone citrato pH=6. Una soluzione di siero di capra (10%) è stata usata per 15 minuti a temperatura ambiente per mascherare i siti di legame aspecifici. L'anticorpo primario è stato incubato a 4°C per 16 ore. È stato utilizzato il seguente anticorpo primario: anti-p27/Kip1 (clone-EPFHCR16, Eptomics) 1:100/1:50. Le sezioni sono state lavate 2 volte in PBS 0.1M pH=7,2. Come anticorpo secondario è stato utilizzato un anticorpo prodotto in topo coniugato a perossidasi di rafano (EnVision system, DAKO) incubato per 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo ripetuti lavaggi con PBS la colorazione immunostochimica è stata visualizzata mediante il substrato di-amino-benzidina (Sigma Chemical Company). Le fettine sono state sciacquate in acqua distillata e contro-colorate con ematossilina. I controlli negativi sono stati ottenuti omettendo l'anticorpo primario.

Analisi microarray

I campioni epatici dei topi sono stati omogeneizzati e risospesi in Trizol Reagent (Invitrogen) e gli RNA sono stati estratti secondo le indicazioni della ditta. 500 ng di RNA sono stati ibridati sul chip Agilent Whole Mouse Gene Expression Microarray (Agilent Technologies), seguendo il protocollo indicato dalla ditta e citato in un

precedente articolo(72). Le immagini a 5 μm di risoluzione sono state acquisite mediante lo scanner Agilent e il software Feature Extraction 10.5 (Agilent Technologies) è stato usato per ottenere i “raw-data”. I risultati sono stati analizzati mediante il software GeneSpring GX versione 11 (Agilent Technologies). I dati sono stati normalizzati in modo da portare tutti i valori negativi a 1 ed è stata effettuata la normalizzazione quantilica. I segnali sono stati filtrati in modo da mantenere solo quelli derivati da sonde espresse in almeno un campione. Sono stati considerati diversamente espressi i geni che avevano una differenza di espressione di almeno 2 volte nei due gruppi di campioni e un valore di significatività $p < 0,05$.

Analisi statistiche

Gli istogrammi riportati mostrano la media delle misurazioni dei replicati sperimentali \pm deviazione standard. Su tutte le analisi effettuate è stato applicato il test statistico T di Student e come soglia di significatività è stato considerato un valore di $p < 0,05$.

RISULTATI

Valutazione dell'espressione del microRNA-221 in campioni clinici di fegato umani.

È stato descritto in precedenza che il microRNA-221 è sovra-espresso in diversi tipi di tumori umani, tra cui l'epatocarcinoma. Per validare il dato, sono stati valutati i livelli di espressione di questo microRNA in una casistica di 70 campioni clinici epatici, nello specifico: 8 campioni di fegato sano (NL), 24 campioni di fegato affetto da cirrosi (CE), 38 campioni di epatocarcinoma (HCC). Rispetto al valore di espressione medio del miR-221 nei campioni di fegato sano, è stata riscontrata un'aumentata espressione del microRNA in 7 campioni cirrotici (pari a 29,2%) e in 30 epatocarcinomi (78,9%), con un *fold change* (il rapporto tra l'espressione del microRNA in ogni campione e il valore medio dei fegati sani) molto variabile nei vari campioni, compreso tra 1,5 e 18. (**Figura 3A**). Inoltre, di 26 pazienti si possedeva sia la lesione tumorale che il corrispondente tessuto sano o cirrotico. Ciò ha permesso di valutare l'evoluzione dell'espressione di miR-221 dal tessuto non neoplastico all'epatocarcinoma dello stesso paziente. È stato riscontrato che l'espressione del microRNA aumentava significativamente ($p < 0,05$) nel campione tumorale, rispetto al corrispondente tessuto di fegato non neoplastico, in 22 casi su 26 coppie analizzate (84,6%), mentre in 2 coppie è stato riscontrato aumento dell'espressione nel tumore, ma tuttavia non significativo. Soltanto in 2 coppie su 26 (7,7%) l'espressione del microRNA restava costante o diminuiva nell'epatocarcinoma rispetto al tessuto non neoplastico (**Figura 3B**). Gli incrementi di espressione del miR-221 in epatocarcinoma, rispetto al tessuto non tumorale corrispondente, variavano da 1,5 a 40 volte.

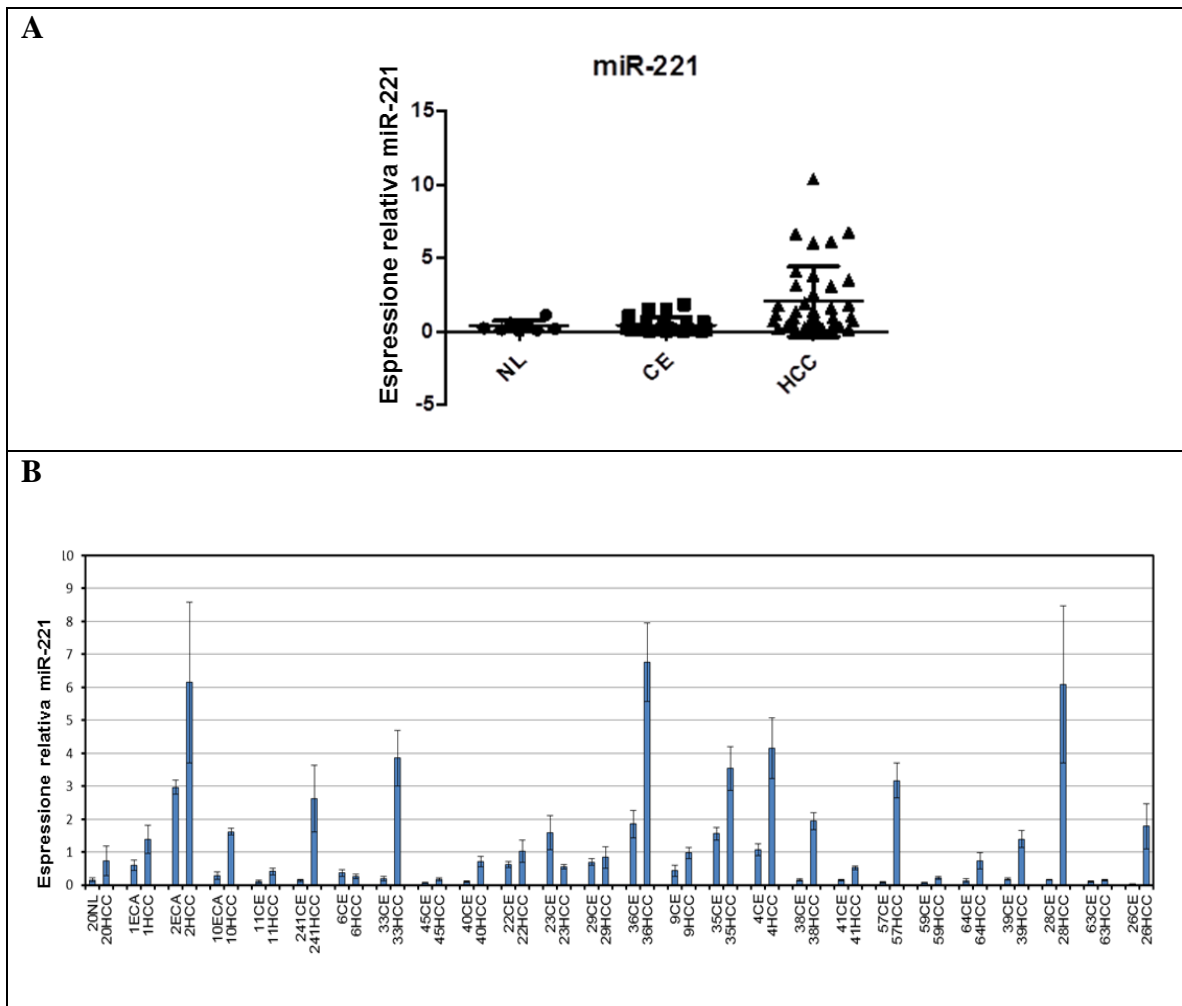


Figura 3. Espressione del miR-221 in campioni clinici di fegato. I valori di espressione del miR-221 sono stati misurati mediante PCR Real Time e normalizzati sull'espressione del RNA ribosomiale 18S, per ogni campione.

A. Il grafico rappresenta i livelli di espressione del miR-221 nei campioni clinici di fegato sano (NL), cirrosi epatica (CE) ed epatocarcinoma (HCC). Un gruppo di campioni tumorali (pari al 78,9%) mostrava sovra-espressione di miR-221 rispetto alla media dei tessuti sani. La sovra-espressione del microRNA si notava anche in una percentuale più bassa (29,2%) di campioni cirrotici.

B. Il grafico mostra l'espressione del microRNA nelle coppie di campioni epatici (tessuto non neoplastico e epatocarcinoma), derivati dallo stesso paziente; come tessuti non neoplastici sono stati considerati campioni derivati da fegato sano (NL), epatite cronica (ECA) e cirrosi epatica (CE). Gli istogrammi relativi ai tessuti non neoplastici e tumorali derivati dallo stesso paziente sono rappresentati accoppiati, in modo da visualizzare la variazione nell'espressione del microRNA. Nel 84,6% delle coppie considerate il miR-221 è espresso maggiormente nel tumore, rispetto al tessuto non neoplastico corrispondente ($p < 0,05$).

Identificazione di bersagli genici del miR-221

Le evidenze sperimentali dimostrano che la sovra-espressione del miR-221 è coinvolta nella tumorigenesi epatica, tuttavia i meccanismi molecolari mediante i quali il microRNA agisce non sono ancora completamente noti. Al fine di meglio comprendere la funzione fisiologica e patologica di un microRNA è necessario individuare i suoi geni bersaglio. Generalmente a tale scopo si utilizzano alcuni algoritmi bioinformatici predittivi, disponibili gratuitamente sul web (per esempio MicroCosm, Diana MicroT, TargetScan, Miranda), che sono in grado di predire i potenziali geni bersaglio dei microRNA, valutando l'omologia di sequenza tra il microRNA e il 3'UTR di tutti i geni.

In questo lavoro è stato utilizzato un approccio alternativo, basato sull'utilizzo del programma Sylamer (EMBL-EBI). Questo algoritmo è in grado di identificare la presenza di significativi arricchimenti di regioni complementari a sequenze *seed* di microRNA in una lista ordinata di geni. A tal fine, cellule SNU-398, una linea cellulare derivata da epatocarcinoma umano caratterizzata da una bassa espressione endogena di miR-221(62), sono state transfettate in triplicato con il precursore del miR-221 o in quadruplicato con un oligonucleotide che fungeva da controllo negativo, chiamato NC2. Dai campioni ottenuti è stata effettuata l'analisi dell'espressione genica mediante microarray (tramite piattaforma Agilent Whole Human Genome Oligo Microarray) e per ogni gene è stato calcolato il *fold change*, ossia il rapporto tra l'espressione media di ogni gene nei due gruppi di campioni a confronto. La lista totale dei geni analizzati è stata filtrata, in modo da eliminare i segnali di bassa qualità e i geni che avevano 3'UTR a bassa complessità. I rimanenti 11971 geni sono stati ordinati secondo *fold change* crescente, in modo da avere per primi i geni meno espressi nelle cellule transfettate con miR-221 rispetto al controllo negativo. Questi dati sono stati forniti come input a Sylamer perché identificasse la presenza di arricchimenti di sequenze bersaglio dei microRNA nella lista di geni fornita. Il programma ha identificato un significativo arricchimento di regioni complementari al miR-221, in corrispondenza dei primi geni della lista (**Figura 4**). Nello specifico, nei primi 1800 geni (corrispondenti ad un *fold change* < -1,15), 602 di questi contenevano nel loro 3' UTR almeno una sequenza complementare alla seed sequence del miR-221: tutti i 602 geni contenevano l'esamero TGTAGC, corrispondente ai nucleotidi 2-7 del microRNA; 548 geni contenevano la sequenza eptamerica TGTAGCA o ATGTAGC,

rispettivamente complementari ai nucleotidi 2-8 e 1-7; 120 geni possedevano una regione complementare all'ottamero ATGTAGCA corrispondente ai nucleotidi 1-8 del miR-221.

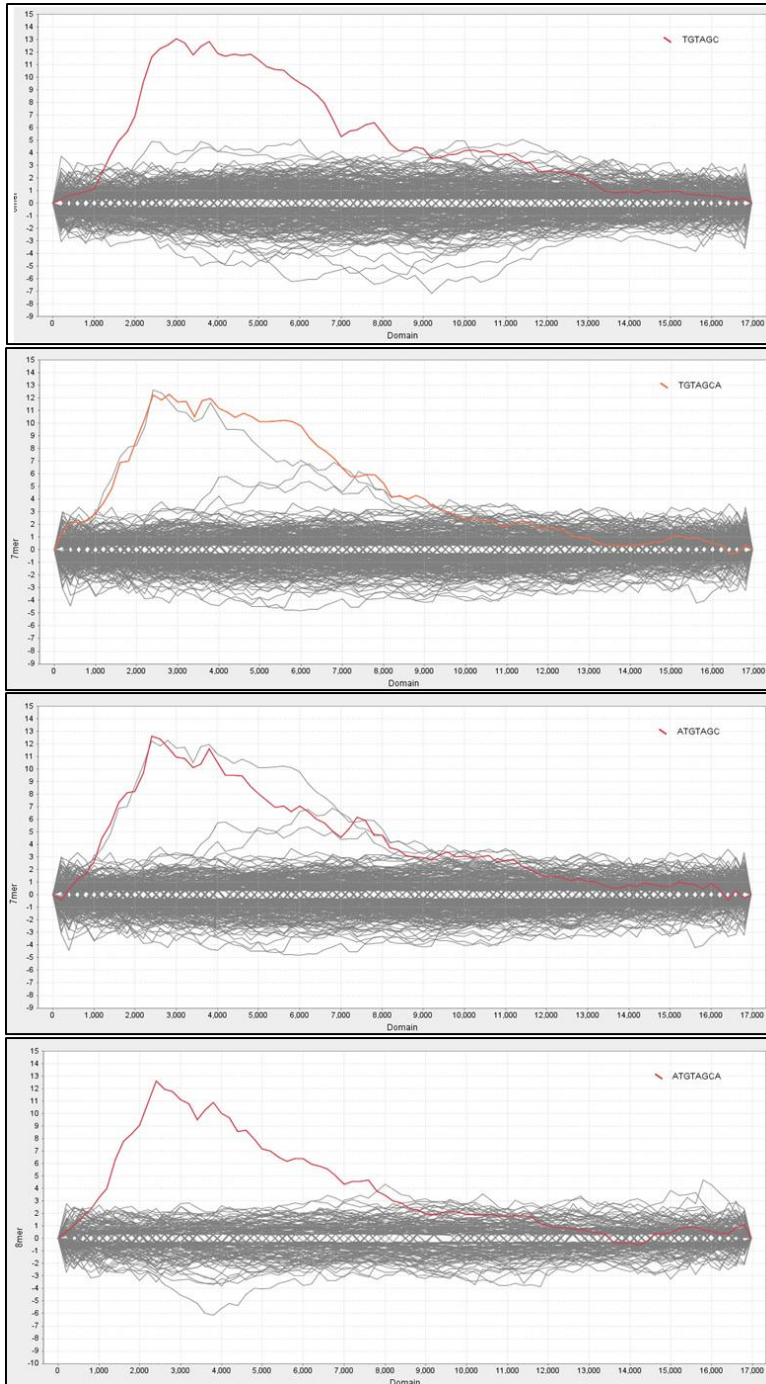


Figura 4. Analisi mediante Sylamer. L'algoritmo consente di identificare significativi arricchimenti di sequenze bersaglio di microRNA in una lista ordinata di geni. Nell'asse delle ascisse sono rappresentati tutti i geni, ordinati secondo *fold change* crescente (da quelli meno espressi, a quelli più espressi nelle cellule transfettate con miR-221, rispetto al controllo negativo). L'asse delle ordinate rappresenta il \log_{10} della probabilità (p) di arricchimenti delle sequenze complementari ai microRNA. Ogni linea indica la distribuzione della probabilità di arricchimento di sequenze complementari ad ogni microRNA nella lista di geni. Le linee colorate nei quattro grafici si riferiscono alle regioni complementari al miR-221. L'analisi è stata ripetuta considerando quattro diverse sequenze *seed*, comprendenti 6, 7 e 8 nucleotidi (le sequenze corrispondenti sono indicate in alto a destra di ogni riquadro. In tutti i casi si nota un arricchimento (visualizzabile come un picco nella linea) di queste sequenze complementari al miR-221 in corrispondenza dei primi geni della lista.

Per valutare la rilevanza di questi risultati, nel gruppo dei primi 1800 geni della lista sono stati ricercati i geni bersaglio del miR-221 già validati in precedenza. Secondo il programma GeneGO (Thomson Reuters, St. Joseph, MI), ad oggi (gennaio 2012) sono stati validati 32 geni bersaglio del microRNA, elencati nella **tabella 4**. Di questi, 12 (38%) sono presenti nel gruppo dei primi 1800 geni individuato dall'analisi Sylamer, mentre 5, sebbene non rientrassero nel gruppo, erano risultati sotto-espresi nelle cellule transfettate con il miR-221, perciò sarebbero potuti rientrare se avessimo scelto una soglia meno stringente. Dei restanti, 6 geni erano risultati sovra-espresi nelle cellule transfettate con il miR-221 e 9 geni non sono stati analizzati dal programma, in quanto non avevano superato i filtri precedenti all'analisi Sylamer. Inoltre, dei 32 geni considerati, 22 (69%) erano predetti come bersagli del miR-221 da alcuni algoritmi di predizione usati (MicroCosm, TargetScan o Diana MicroT) e ciò non stupisce dato che l'utilizzo di questi softwares è il metodo tuttora più usato per l'identificazione dei potenziali geni bersaglio dei microRNA.

Tabella 4. Geni bersaglio del miR-221 già validati (da GeneGo)

	Simbolo	Posizione nella lista di geni ordinata	Lunghezza 3'UTR (pb)	Numero di sequenze bersaglio del miR-221 nel 3'UTR	Fold-change	Espressione in SNU398+miR-221 vs SNU398 + NC2	Algoritmi che predicono il gene come bersaglio del miR-221
1	CDKN1C	134	708	2	-1,51	↓	M + D
2	TIMP3	195	3694	1	-1,46	↓	T
3	THRB	254	5724	1	-1,4	↓	-
4	TRPS1	482	5527	2	-1,31	↓	M + T
5	BMF	574	3898	1	-1,28	↓	M
6	ZADH2	602	6304	2	-1,28	↓	M
7	RALGAPA1	621	1361	2	-1,28	↓	-
8	CDKN1B	818	1344	2	-1,24	↓	D
9	DCUN1D1	1023	2321	1	-1,21	↓	T
10	MDM2	1160	5585	2	-1,2	↓	M
11	DVL2	1260	524	2	-1,19	↓	M
12	BBC3	1570	980	2	-1,16	↓	M + T
13	SEC62	3580	5313	3	-1,06	↓	T
14	FOXO3	4377	4962	1	-1,04	↓	-
15	Hox-B6	4670	661	0	-1,03	↓	-
16	ZEB2	4954	1450	1	-1,02	↓	D
17	PTPRM	5080	699	1	-1,02	↓	-
18	Dicer	6535	4269	2	1,02	↑	-
19	BCL2L11	7207	4214	1	1,05	↑	T
20	NLK	7845	1740	1	1,07	↑	D + M + T
21	PTEN	8628	6458	4	1,10	↑	D
22	DDIT4	10344	848	2	1,20	↑	-
23	Ets1	10482	3600	3	1,21	↑	-
24	ARHI	Non rilevato					M
25	ESR1	Non rilevato					-
26	SLM1	Non rilevato					D + M
27	KIT	Non rilevato					D
28	PI3KR1	Non rilevato					D + T
29	SEMA6D	Non rilevato					D
30	SLC4A4	Non rilevato					-
31	TNF	Non rilevato					-
32	FOG2	Non rilevato					M + T

M = MicroCosm, T=TargetScan, D=Diana MicroT

Come detto in precedenza, generalmente per l'identificazione di bersagli putativi dei microRNA si utilizzano programmi di predizione on-line, che basano la loro analisi esclusivamente su calcoli teorici. Considerando i 602 geni individuati sulla base della soglia scelta in seguito all'analisi Sylamer e aventi nel loro 3'UTR almeno una sequenza esamerica complementare al miR-221, abbiamo valutato quanti di questi fossero predetti come bersagli del miR-221 anche da alcuni algoritmi di predizione comunemente usati (MicroCosm, TargetScan, Diana microT). Soltanto 125 geni (21%) sono stati identificati da almeno uno dei tre programmi. Perciò i restanti 477 geni costituivano nuovi potenziali geni bersaglio del miR-221 che non sarebbero emersi utilizzando questi algoritmi predittivi.

Studio delle vie di segnale cellulari indotte dal miR-221

Considerando la lista dei 602 geni identificati come potenziali bersagli del miR-221, mediante approccio bioinformatico è stata effettuata l'analisi delle vie di segnale intracellulari in cui questi geni sono coinvolti, al fine di identificare le vie cellulari potenzialmente alterate dal miR-221. È stato utilizzato a tale scopo un apposito algoritmo incluso nel software Genespring GX 11 (Agilent, Santa Clara, CA), che permette di raggruppare ampie liste di geni in base ai processi biologici in cui sono coinvolti. Le vie di segnale significative individuate sono molteplici, tuttavia si notava un coinvolgimento di numerose vie implicate nella regolazione del ciclo cellulare e dell'apoptosi (**Tabelle 5**), suggerendo un probabile ruolo oncogenico del miR-221 legato a questi processi cellulari.

Tabella 5. Vie di segnale in cui sono coinvolti i geni predetti dall'analisi Sylamer.

Via di segnale (GeneSpring)	Valore di significatività (p)	n° geni bersaglio
Rimodellamento osseo	2,57E-03	3
Differenziazione dei cheratinociti	3,32E-03	4
Via di segnale di P53	3,46E-03	3
Via di segnale di NGF (fattore di crescita neuronale)	4,51E-03	3
Via di segnale di ATM	7,14E-03	3
Via di segnale di CTCF	7,14E-03	3
Via di segnale di FAS (cd95)	7,14E-03	3
Via di segnale di RB: blocco proliferativo in risposta a danno a DNA	7,14E-03	3
Via di segnale di ceramide	8,52E-03	4
Oncosoppressore ARF inibisce biogenesi ribosomale	1,05E-02	3
Regolazione fosforilazione di p27 durante progressione ciclo cellulare	1,19E-02	2
Via di segnale di igf-1	1,47E-02	3
Via di segnale di interferon	1,63E-02	2
Espressione genica indotta da RNA a doppio filamento	1,63E-02	1
Via di segnale dei peptidi bioattivi	1,71E-02	2
Via di segnale di recettori fc epsilon nelle mast cellule	1,96E-02	3
Via di segnale regolatoria di cdc25 e chk1 in risposta al danno al DNA	2,13E-02	2
Metabolismo della vitamina B6	2,13E-02	2
Via di segnale di pdgf	2,24E-02	2
Via di segnale di bcr	2,54E-02	2
Via di segnale mediata da calcio di hbx (virus dell'epatite B)	2,69E-02	2
Via di segnale di il-7	2,69E-02	1
Inibizione delle metalloproteinasi	2,69E-02	2
Regolazione di eif2	2,69E-02	2
West Nile Virus	2,69E-02	2
TFF nella riparazione della mucosa	2,86E-02	2
Via di segnale delle map-kinase	2,89E-02	4
Via di segnale delle integrine	2,93E-02	1
Via di segnale di EPHA2	2,93E-02	1
Via di segnale di EPHB	2,93E-02	1
Via di segnale di EPHA	2,93E-02	1
Via di segnale di ErbB4	2,93E-02	1
Integrine e angiogenesi	2,93E-02	1
Eventi mediati da a4b1 e a4b7, indipendenti da Paxillina	2,93E-02	1
Via di segnale PLK3	2,93E-02	1
Via di segnale di VEGFR1 e VEGFR2	2,93E-02	1
Via di segnale regolata da Ret tyrosine kinase	2,93E-02	1
Hiv-1 nef: effettore negativo di fas e tnf	3,20E-02	3
Influenza di ras e rho sulla transizione G1-S	3,20E-02	3
Arresto del Ciclo cellulare e apoptosi dipendente da pten	3,30E-02	2
Inattivazione di gsk3 mediata da akt causa accumulo di β -catenina nei macrofagi alveolari	3,56E-02	2
Via di segnale di t cell receptor	3,94E-02	2
Metabolismo del metano	3,95E-02	2
Sumoilazione mediata da ranbp2 regola repressione trascrizionale	3,95E-02	2
Via di segnale apoptotica in risposta a danno al DNA	4,65E-02	2
Ruolo dei mitocondri nelle vie di segnale pro-apoptiche	4,65E-02	2

In parallelo all'analisi bioinformatica, al fine di studiare le vie di segnale intracellulari che sono modulate dal miR-221, sono state effettuate delle analisi sperimentali in cellule SNU-398 (derivate da epatocarcinoma umano), transfettate transientemente con miR-221 o con il controllo negativo NC2. Inoltre sono state utilizzate cellule SNU-398 sovra-esprimenti costantemente miR-221 (SNU-398/miR-221). La **Figura 5** mostra il livello di espressione del miR-221 nei cloni stabili ottenuti, a paragone con le stesse cellule *wild type*.

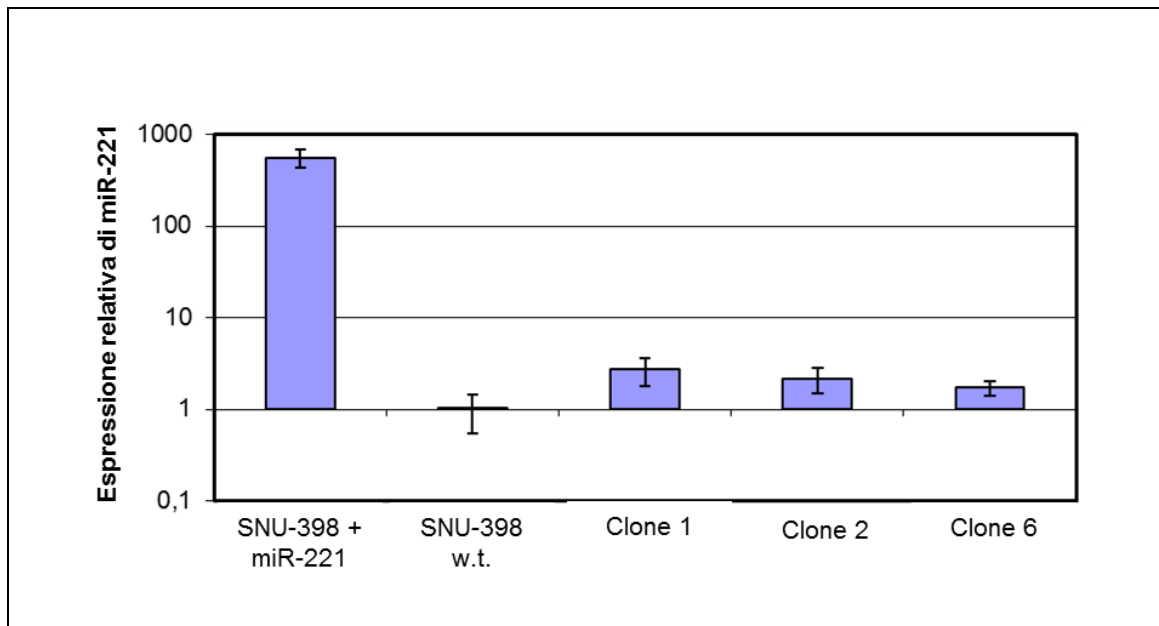


Figura 5. Espressione del miR-221 nei cloni stabili di cellule SNU-398. È stato valutato il livello di espressione del miR-221 nei cloni stabili ottenuti, rispetto alle cellule *wild type* non trattate. I valori di espressione del microRNA per ogni campione sono stati normalizzati sulla relativa espressione dell'RNA ribosomale 18S. Il primo istogramma (SNU-398 + miR-221) rappresenta il livello del miR-221 nelle cellule transfettate transientemente con il precursore del miR-221. I 3 cloni mostrano una significativa sovra-espressione del miR-221 rispetto alle cellule wild type ($p < 0,05$), con un incremento che varia da 1,7 (clone 6) a 2,7 volte (clone 1).

Al fine di valutare gli effetti della sovra-espressione del miR-221 nelle cellule derivate da epatocarcinoma, è stato utilizzato il kit luciferasico Cignal Finder Cancer 10-Pathway Reporter Array (SABiosciences), che permette di analizzare in un unico esperimento il livello di attivazione di dieci vie di segnale frequentemente coinvolte in cancro, in particolare le vie di:

1. Wnt (fattore di trascrizione: TCF/LEF)
2. Notch (fattore di trascrizione: RBP/Jk)
3. p53/danno al DNA (fattore di trascrizione: p53)
4. TGF β (fattore di trascrizione: SMAD)
5. Proliferazione cellulare/pRb-E2F (fattore di trascrizione: E2F)
6. NF κ B (fattore di trascrizione: NF κ B)
7. Myc/Max (fattore di trascrizione: Myc)
8. Ipoxia (fattore di trascrizione: HIF)
9. MAPK/ERK (fattore di trascrizione: SRE)

10. MAPK/JNK (fattore di trascrizione: AP1)

L'esperimento è stato effettuato nelle cellule SNU-398 transfettate in transiente con il miR-221 e con il controllo negativo NC2 e in uno dei cloni stabili sovra-esprimenti il miR-221, a paragone con le cellule *wild type*. Il grafico in **figura 6A** mostra i risultati ottenuti. Diverse vie di segnale apparivano attivate nelle cellule in cui era stata indotta l'espressione del miR-221: le vie di NFκB, Myc/Max risultavano attivate significativamente in entrambe le condizioni (transfezione transiente e stabile), rispetto ai relativi controlli; la via di pRB-E2F e di Wnt/β-catenina sono risultate indotte in modo significativo solo nel clone stabile rispetto alle cellule *wild type*. Al fine di riconfermare questi risultati, sono stati effettuati saggi luciferasici in cellule transfettate con diversi plasmidi reporter contenenti il gene della luciferasi di lucciola sotto il controllo di promotori responsivi a specifici fattori trascrizionali, coinvolti nelle vie di segnale in studio. I costrutti reporter utilizzati sono pRB-TA-LUC e pE2F-TA-LUC (Mercury Pathway Profiling System, Clontech), per studiare la via legata alla regolazione del ciclo cellulare, ad opera dei fattori RB e E2F, pMYC-TA-LUC, pNFκB-LUC (Pathway Profiling System, Clontech), per le vie controllate dagli omonimi fattori trascrizionali, pGL3-OT (fornito da Bert Vogelstein), responsivo alla via di segnale di β-catenina. Il saggio si basava sul fatto che il fattore di trascrizione presente nelle cellule in forma attiva legava il corrispondente promotore contenuto nei plasmidi a monte del gene luciferasico, inducendo l'espressione del gene reporter; perciò un aumento dell'attività luciferasica nel campione era indice di aumentata presenza del relativo fattore trascrizionale nel campione e quindi di attivazione della via di segnale corrispondente. Al contrario la proteina RB quando agisce come diretto regolatore trascrizionale, provoca inibizione dell'espressione del gene a valle(75); perciò un aumento nell'attività luciferasica nelle cellule transfettate con il costrutto pRB-TA-LUC era indice di diminuita presenza di RB in forma attiva nel campione. I saggi luciferasici sono stati effettuati in cellule SNU-398 *wild type*, nei 3 cloni stabili di cellule SNU-398/miR-221 e negli stessi cloni, transfettati con un oligonucleotide modificato, complementare al miR-221 e in grado di bloccare la funzione (anti-miR-221). I risultati hanno dimostrato che tutte le vie di segnale analizzate venivano indotte nei cloni stabili, rispetto alle cellule *wild type*, tuttavia l'effetto sembrava essere specificamente legato al miR-221 solo per le vie di RB e β-catenina, in quanto nei campioni transfettati con i costrutti pRB-TA-LUC e pGL3-OT l'utilizzo dell'anti-miR-221 causava in tutti i cloni una parziale, ma significativa diminuzione

dell'attività luciferasica, rispetto ai cloni non transfettati ($p < 0,05$) (**figura 6B**). Perciò, dai saggi luciferasici effettuati è risultato che la sovra-espressione di miR-221 provocava nelle cellule una diminuzione della quantità di RB in forma attiva e un'induzione della via di segnale di β -catenina, entrambe condizioni che favoriscono la proliferazione cellulare. Perciò i risultati sperimentali hanno confermato quelli dedotti dall'analisi bioinformatica, secondo cui il miR-221 era in grado di indurre vie di segnale pro-proliferative e anti-apoptotiche nelle cellule.

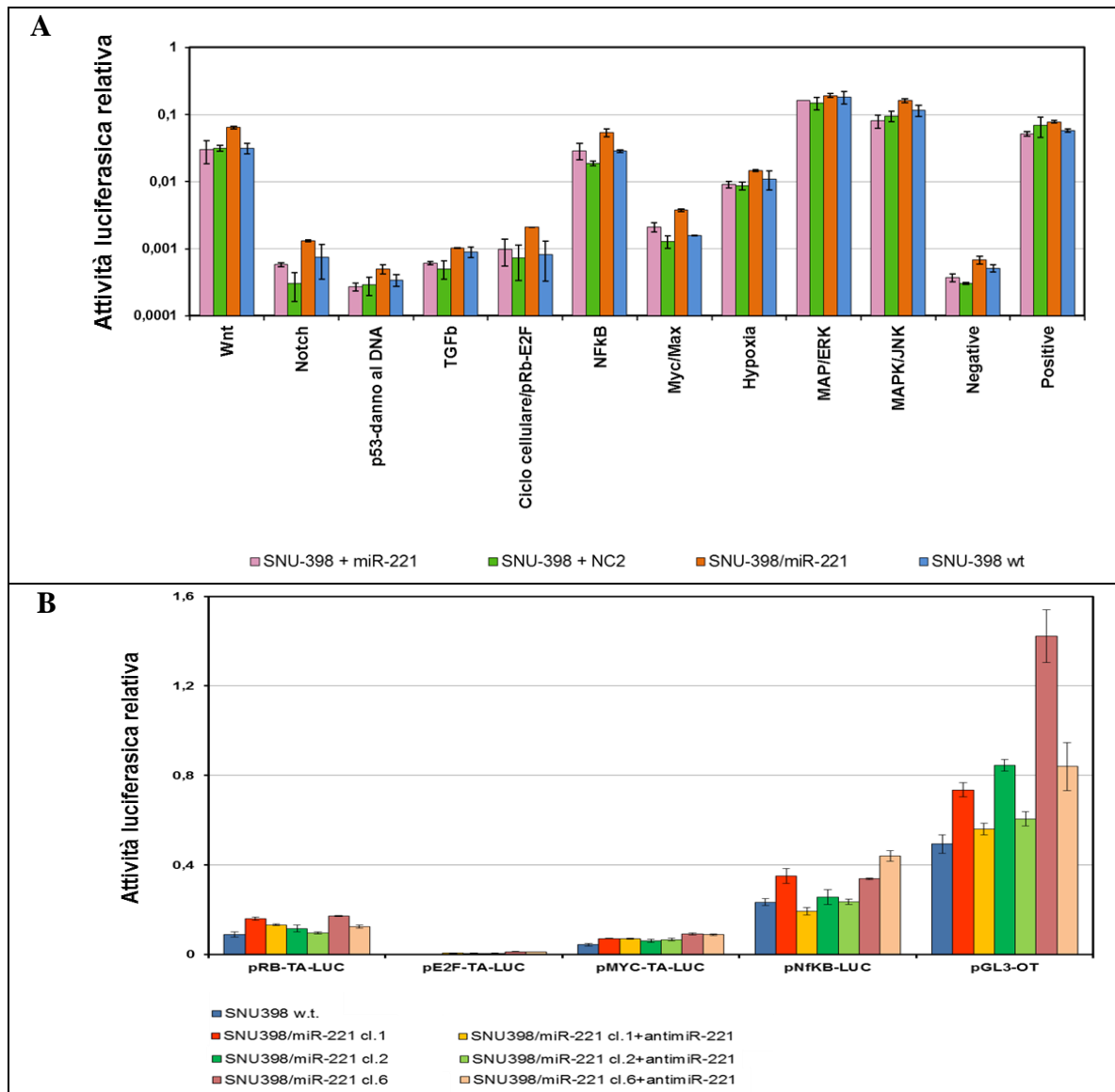


Figura 6. Il miR-221 induce le vie di segnale di pRB/E2F e β -catenina. In tutti gli istogrammi, l'asse delle ascisse indica il nome della via di segnale, l'asse delle ordinate indica l'attività luciferasica di lucciola, normalizzata sull'attività della luciferasi di renilla per ogni campione.

A. L'istogramma rappresenta i risultati dell'esperimento effettuato mediante il kit Cignal Finder Cancer 10-Pathway Reporter Arrays (SABiosciences).

B. L'istogramma rappresenta i risultati dei saggi luciferasici effettuati nei cloni stabili SNU-398/miR-221 per studiare le vie di segnale di RB/E2F, Myc, NFkB e β -catenina, al fine di validare i risultati ottenuti dal kit Cignal Finder Cancer 10-Pathway Reporter Arrays. Accanto ai plasmidi reporter, sono stati utilizzati i plasmidi di controllo pTA-LUC, pTAL-LUC (Pathway Profiling System, Clontech) e pGL3-OF (fornito da Bert Vogelstein), al fine di valutare il *background* luciferasico nei campioni analizzati. Il valore di luminescenza corrispondente al *background* misurato per ogni campione è stato sottratto ai valori di attività luciferasica dei costrutti reporter. Le vie di segnale che si sono riconfermate essere attivate in presenza di miR-221 sono le vie di pRB/E2F e β -catenina.

Validazione di nuovi geni bersaglio del miR-221

Dalla lista di 602 geni identificati dall'analisi Sylamer come potenziali bersagli del miR-221, abbiamo scelto di studiarne alcuni, in quanto già noti per il loro coinvolgimento in vie di segnale pro-proliferative e anti-apoptotiche, che sono indotte dal microRNA. I geni scelti sono: retinoblastoma 1 (RB1) e WEE1, due inibitori del ciclo cellulare; apoptotic peptidase activating factor 1 (APAF1), gene pro-apoptotico; Annessina A1 (ANXA1), gene coinvolto in numerosi processi cellulari, legati a differenziamento e proliferazione cellulare; CCCTC-binding factor (CTCF), che codifica per un repressore trascrizionale. Al fine di riconfermare i risultati dell'analisi microarray e Sylamer, da cui questi geni sono emersi e che li avevano individuati come sotto-espressi nelle cellule sovra-esprimenti miR-221, è stato valutato il livello di espressione degli RNA messaggeri dei geni in esame, in campioni di cellule SNU-398 ed HepG2 (entrambe derivate da epatocarcinoma) transfettati con miR-221 o con il controllo negativo corrispondente (NC2), mediante PCR Real Time. Il grafico in **figura 7** mostra i risultati dell'analisi: il miR-221 provocava una significativa diminuzione nella quantità degli RNA messaggeri di tutti i geni in esame, in entrambe le linee cellulari, rispetto ai relativi controlli ($p < 0,018$).

Tabella 6. Potenziali geni bersaglio del miR-221, oggetto di questo studio.

Simbolo	Posizione nella lista geni ordinata	Lunghezza 3'UTR (pb)	Numero di sequenze bersaglio del miR-221 nel 3'UTR	Fold-change	Espressione in SNU398+miR-221 vs SNU398 + NC2	Algoritmi che predicono il gene come bersaglio del miR-221
RB1	1087	1915	2	-1,2	↓	
APAF1	430	2945	2	-1,3	↓	
ANXA1	1580	718	2	-1,16	↓	M
WEE1	1598	1382	1	-1,16	↓	
CTCF	302	1308	2	-1,37	↓	D

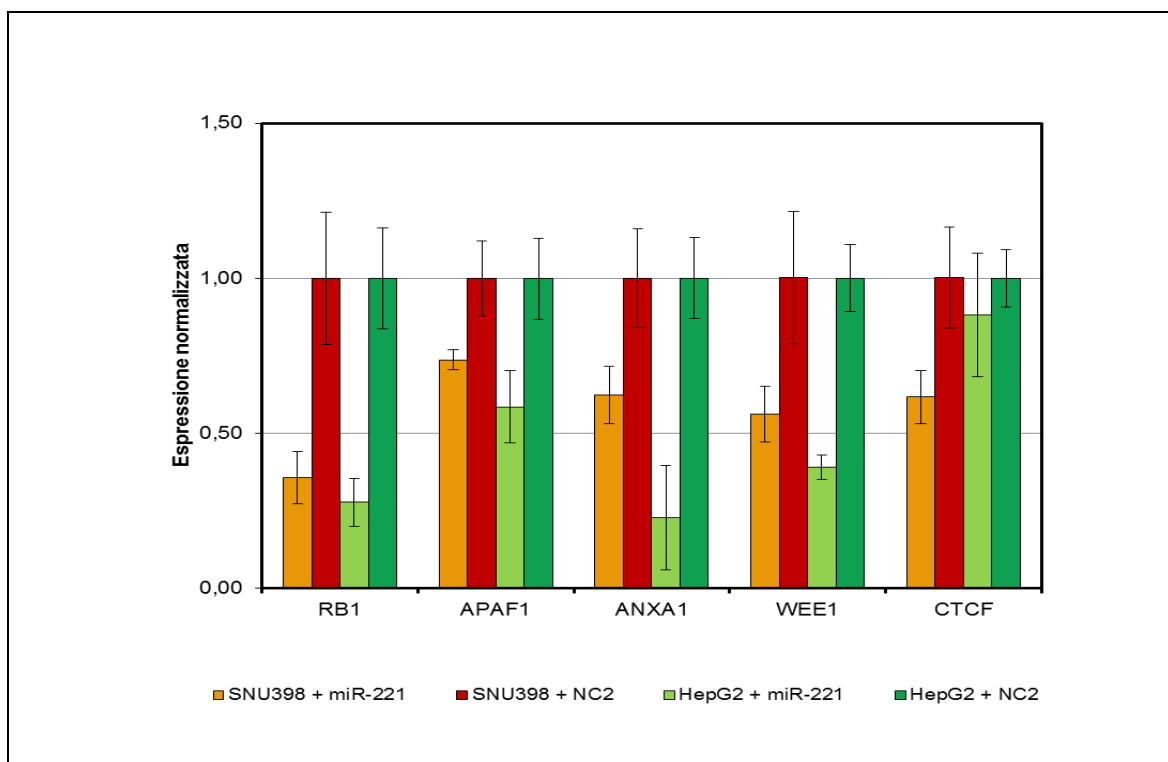


Figura 7. Livello di espressione dei potenziali geni bersaglio del miR-221. I valori di espressione dei singoli geni sono stati normalizzati sull'espressione di 18S e GAPDH per ogni campione. Il miR-221 causava una diminuzione dei livelli di RNA messaggero di tutti i geni, riscontrabile sia in SNU-398 che in HepG2. Il calo di espressione dell'mRNA di CTCF nelle HepG2 transfettate con miR-221 non è risultato significativo ($p = 0,12$).

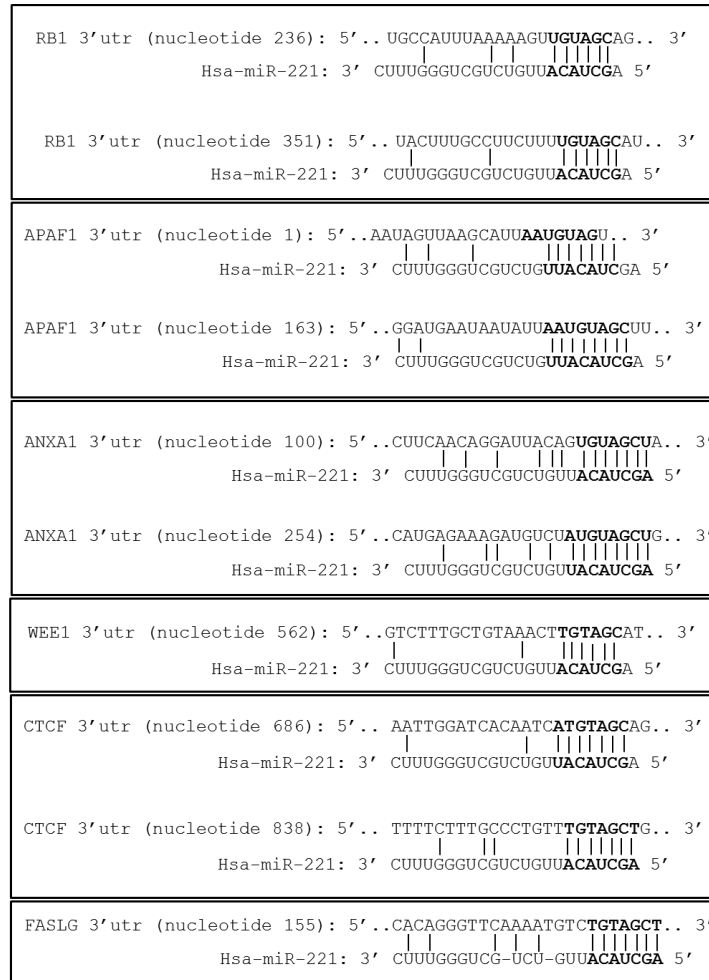
Dopo aver riconfermato che l'espressione degli RNA messaggeri dei geni in esame diminuiva significativamente in presenza di miR-221, è stato necessario effettuare alcuni esperimenti per verificare se questi geni fossero bersagli del microRNA.

Tutti i geni in analisi contenevano almeno una sequenza complementare alla sequenza *seed* del miR-221 nel loro 3'UTR. Insieme ai geni in esame, è stato considerato Fas Ligand (FASLG), un altro potenziale gene bersaglio del miR-221, il cui 3'UTR conteneva una regione complementare al microRNA, ma che non apparteneva alla lista di geni individuata dall'analisi Sylamer. Nella **tabella 7** e nella **figura 8** sono elencati tutti i geni, la posizione della sequenza bersaglio del miR-221 sul 3'UTR e gli appaiamenti tra mRNA e miR-221.

Tabella 7. Caratteristiche dei geni studiati come potenziali bersagli del miR-221.

Nome del gene	Simbolo	Refseq	n° sequenze bersaglio del miR-221	Lunghezza delle sequenze bersaglio del miR-221 (pb)
Retinoblastoma 1	RB1	NM_000321	2	6 + 6
Apoptotic peptidase activating factor 1	APAF1	NM_181861	2	7 + 8
Annexin A1	ANXA1	NM_000700	2	7 + 8
WEE1 homolog (S. pombe)	WEE1	NM_003390	1	6
CCCTC-binding factor (zinc finger protein)	CTCF	NM_006565	2	7 + 7
Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	FASLG	NM_000639	1	7

Figura 8. Caratteristiche dei geni studiati come potenziali bersagli del miR-221. Le immagini rappresentano gli appaiamenti tra il miR-221 e le sue sequenze bersaglio sul mRNA dei geni. In grassetto è evidenziata la sequenza *seed*. I numeri tra parentesi indicano la posizione sul 3'UTR della sequenza del mRNA riportata.



Per verificare se ci fosse un'effettiva interazione tra l'RNA messaggero di questi geni e il miR-221, sono stati effettuati dei saggi luciferasici. A tal fine è stato necessario creare dei costrutti reporter luciferasici, utilizzando il plasmide *psiCHECK-2* (Promega) (**Figura 9**), che contiene al suo interno il gene reporter della luciferasi di renilla e il gene codificante per la luciferasi di lucciola (usato come normalizzatore sperimentale). Sono stati disegnati i primers per l'amplificazione delle regioni geniche contenenti la sequenza bersaglio del miR-221 (dove presenti due sequenze bersaglio sullo stesso 3'UTR, i primers per il clonaggio sono stati disegnati in modo da includerle entrambe nello stesso amplificato) e le regioni amplificate sono state clonate a valle del gene codificante per la luciferasi di renilla. In questo modo, se il miR-221 era in grado di interagire con la sua sequenza bersaglio clonata a valle del gene luciferasico, veniva inibita l'espressione dell'enzima e, di conseguenza, si riscontrava un calo nella luminescenza misurata del campione.

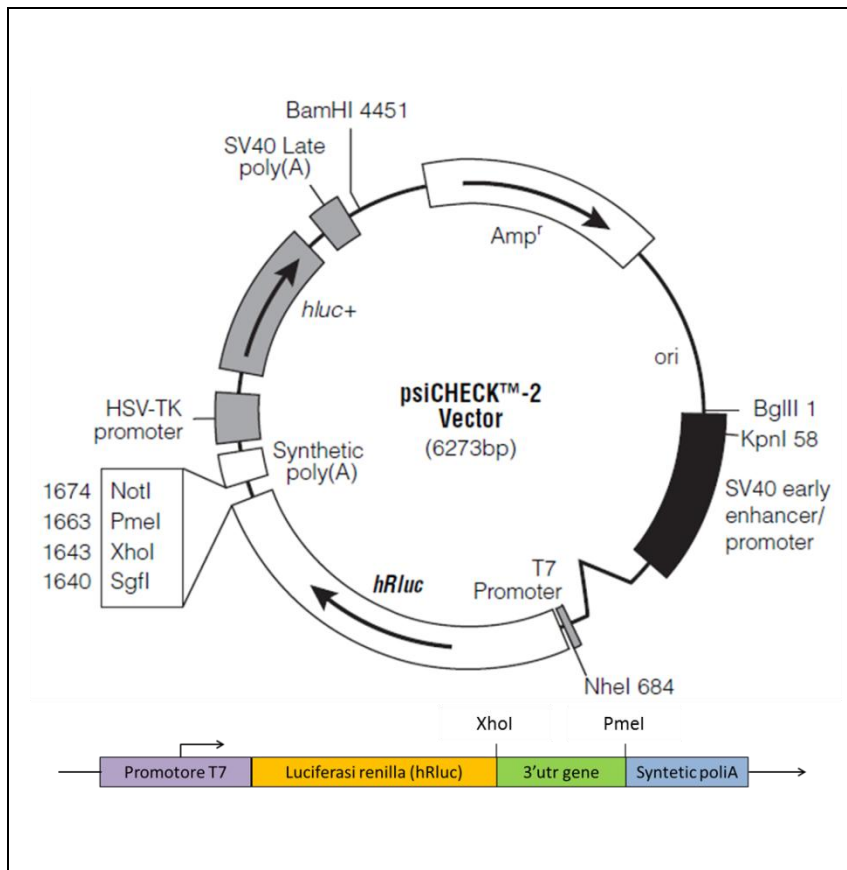
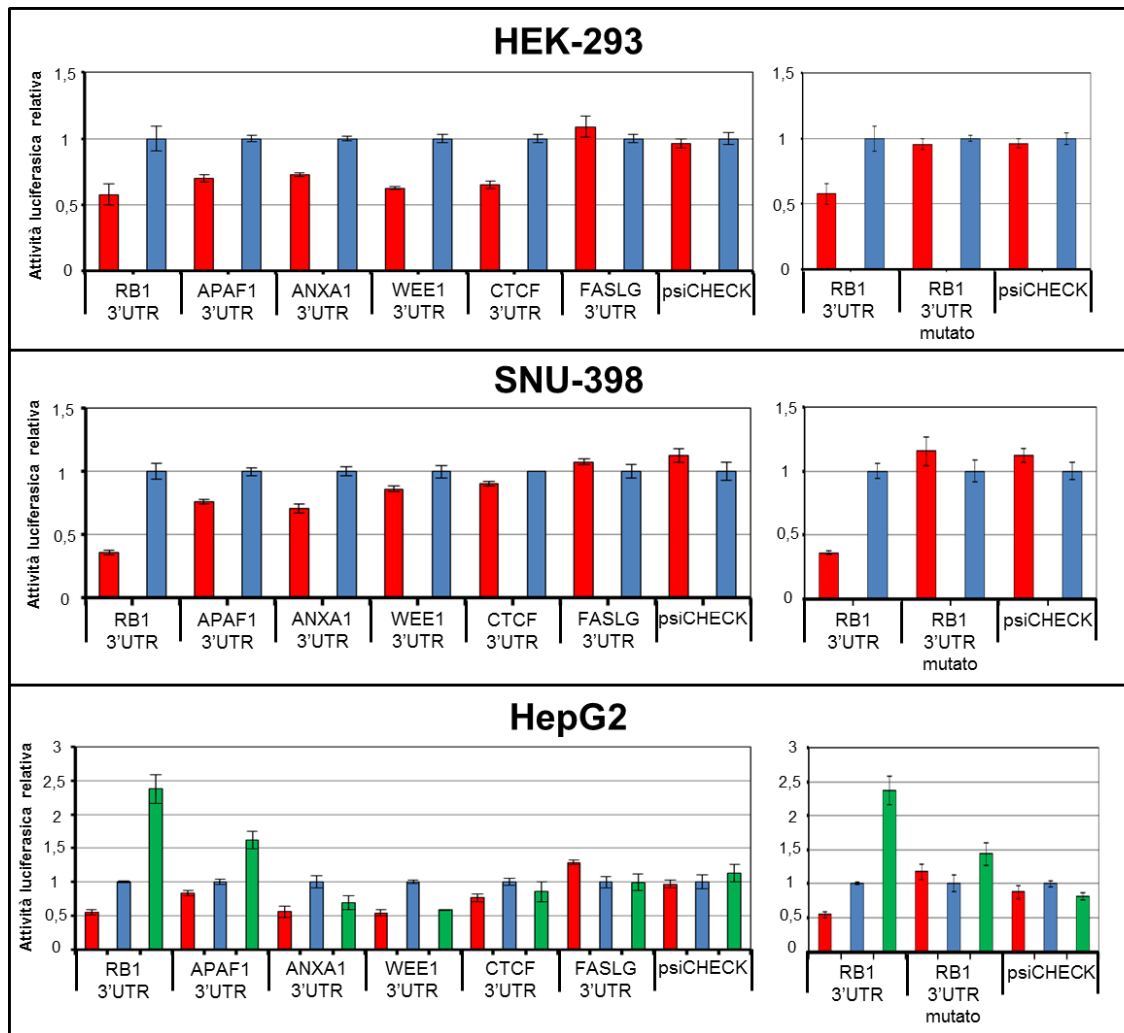


Figura 9. Vettore psiCHECK-2 (Promega). Le porzioni di 3'UTR dei geni, contenenti le sequenze bersaglio del miR-221, sono state clonate utilizzando i siti di restrizione XhoI e PmeI, a valle del gene della luciferasi di renilla (hRluc). Il gene hLuc+ codifica per la luciferasi di lucciola, la cui attività viene utilizzata come normalizzatore sperimentale.

Il saggio luciferasico è stato effettuato in cellule HEK293, derivate da rene embrionale, che sono state scelte come veicolo sperimentale iniziale, grazie alla loro duttilità e facilità di transfezione; successivamente il saggio è stato ripetuto nelle linee SNU-398 e HepG2, entrambe derivate da epatocarcinoma e che quindi costituivano un modello più indicato per questo studio. Le cellule sono state transfettate con i costrutti luciferasici, in presenza di miR-221 o del controllo negativo (transfettati transientemente); nelle HepG2 è stato utilizzato anche l'oligonucleotide anti-miR-221, necessario per bloccare i livelli endogeni di miR-221 espressi da queste cellule. I risultati dei saggi luciferasici sono illustrati in **figura 10**: il miR-221 era in grado di indurre una diminuzione dell'attività luciferasica di tutti i costrutti, rispetto all'attività riscontrata nei campioni transfettati con il controllo negativo (NC2); nello specifico nei campioni transfettati con il vettore contenente una parte del 3'UTR di RB1 è stato riscontrato un calo dell'attività luciferasica in presenza di miR-221 pari al 43% in HEK293, al 63% in SNU-398 e al 45% in HepG2; il miR-221 ha causato una diminuzione dell'attività luciferasica relativa del costrutto *psiCHECK-APAF1 3'UTR* rispettivamente del 30%, 24% e del 16% nelle tre linee; analogamente, è stato riscontrato un calo del 27%, 30%, 44% nelle tre linee cellulari transfettate con

psiCHECK-ANXA1 3'UTR; per il costrutto *psiCHECK-WEE1 3'UTR* il miR-221 ha causato un calo di attività luciferasica pari al 38% in HEK293, 14% in SNU-398 e 46% in HepG2; infine nelle cellule transfettate con il costrutto *psiCHECK-CTCF 3'UTR* il microRNA ha provocato una diminuzione rispettivamente del 35%, 11% e 24% nell'espressione luciferasica delle tre linee. Tutti i dati riportati sono significativi ($p < 0,05$). L'anti-miR-221 utilizzato nelle cellule HepG2 ha provocato invece un aumento significativo dell'attività luciferasica solo dei costrutti *psiCHECK-RB1 3'UTR* ($p = 0,0002$) e *psiCHECK-APAF1 3'UTR* ($p = 0,0006$), rispetto al controllo trattato con NC2. Nessuna significativa variazione nell'attività luciferasica nelle diverse condizioni è stata riscontrata nei campioni transfettati con il vettore vuoto *psiCHECK* e con il costrutto *psiCHECK-FASLG 3'UTR*. Perciò nonostante FASLG contenga nel suo 3'UTR una sequenza complementare al miR-221, il saggio luciferasico ha escluso che ci sia interazione tra le due molecole; al contrario tutti i geni individuati dall'analisi Sylamer sono stati validati da questo saggio. Questo dato conferma il valore dell'analisi Sylamer nella predizione dei potenziali geni bersaglio dei microRNA.

Per dimostrare che l'effetto sulla variazione di attività luciferasica fosse dovuto specificamente alle sequenze bersaglio del miR-221, dal costrutto *psiCHECK-RB1 3'UTR* sono state delete le due sequenze esameriche complementari al miR-221, presenti sulla porzione del 3'UTR del gene RB1 clonata. Il costrutto così ottenuto, chiamato *psiCHECK-RB1 3'UTR mutato* è stato utilizzato per effettuare saggi luciferasici analogamente a quanto fatto in precedenza. I risultati mostrano che le variazioni di attività luciferasica ottenute con il vettore *psiCHECK-RB1 3'UTR*, in presenza di miR-221 o anti-miR-221, rispetto al controllo negativo, vengono annullate nelle cellule transfettate con il costrutto *psiCHECK-RB1 3'UTR mutato*, in cui sono assenti le sequenze complementari al microRNA (**Figura 10**).



■ miR-221 ■ NC2 ■ anti-miR-221

Figura 10. Saggi luciferasici per validare l'interazione tra i geni bersaglio e il miR-221. Per ottenere l'attività luciferasica relativa, l'attività della luciferasi di renilla misurata per ogni campione è stata normalizzata sulla relativa luminescenza di lucciola. Gli istogrammi rappresentano il valore medio misurato nei triplicati sperimentali per ogni campione. Gli esperimenti per validare i geni bersaglio in analisi sono stati effettuati in tre diverse linee cellulari. Rispetto a dove somministrato il controllo NC2, in presenza di miR-221 si nota un calo dell'attività luciferasica relativa in tutti i campioni transfettati con i costrutti luciferasici contenenti le porzioni complementari al microRNA dei geni in esame. L'utilizzo dell'anti-miR-221 nelle HepG2 invece provocava significativo aumento dell'attività luciferasica riscontrabile solo per i costrutti *psiCHECK-RB1 3'UTR* e *psiCHECK-APAF1 3'UTR*. Non si è riscontrata nessuna variazione nei campioni transfettati con *psiCHECK-FASLG 3'UTR* e con il vettore vuoto *psiCHECK*. Gli istogrammi sulla destra mostrano i saggi luciferasici effettuati nelle stesse linee cellulari, utilizzando il costrutto mutagenizzato *psiCHECK-RB1 3'UTR mutato* a confronto con *psiCHECK-RB1 3'UTR*. La delezione dei siti bersaglio del miR-221 nel costrutto *psiCHECK-RB1 3'UTR mutato* causava l'annullamento degli effetti sull'attività luciferasica dovuti alla transfezione del miR-221 e dell'anti-miR-221, riscontrati con il vettore non mutagenizzato, in tutte le linee cellulari.

Come ulteriore validazione dei geni bersaglio del miR-221 è stata effettuata l'analisi di espressione delle proteine: cellule SNU-398 ed HepG2 sono state transfettate con miR-221 o con il controllo negativo NC2 e analogamente i cloni di cellule SNU-398/miR-221 che esprimevano costitutivamente il microRNA sono stati trattati con l'oligonucleotide anti-miR-221. Gli estratti proteici dei campioni sono stati utilizzati per identificare le proteine corrispondenti ai geni in analisi. Per problemi sperimentali non è stato possibile identificare la proteina CTCF, mentre tutte le altre sono state correttamente identificate. Tutte le proteine mostravano una minor espressione nelle cellule transfettate con il miR-221, rispetto a quelle transfettate con il controllo; nei cloni stabili al contrario il trattamento con l'anti-miR-221 causava un aumento dei livelli delle proteine bersaglio, rispetto alle cellule non trattate (**Figura 11**). Perciò, la sovra-espressione del miR-221 provocava in tutte le condizioni una diminuzione nella quantità delle proteine codificate dai geni bersaglio. Questi risultati hanno confermato che i geni identificati mediante questa nuova strategia basata sull'algoritmo Sylamer erano effettivamente bersagli del miR-221.

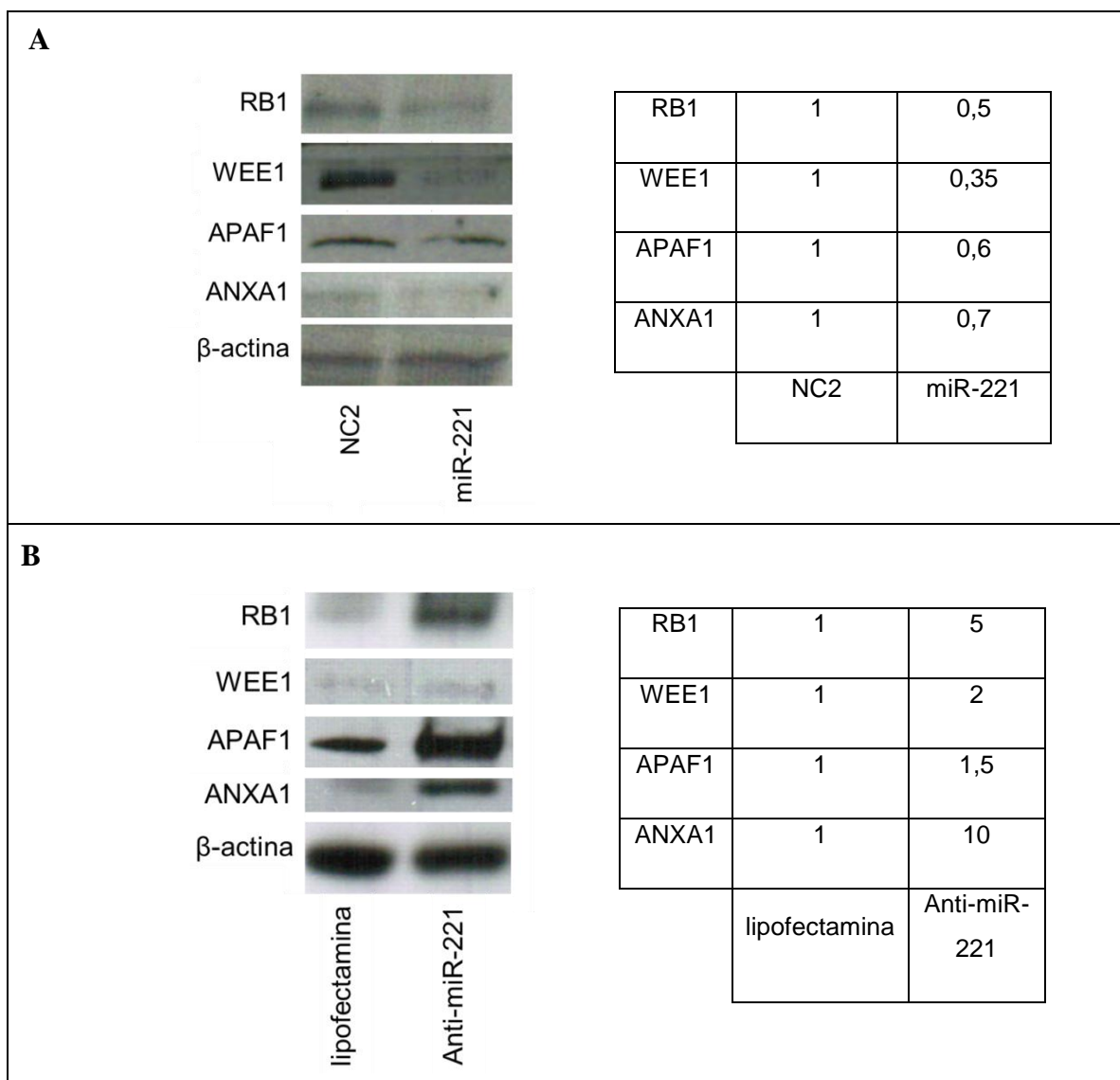


Figura 11. Valutazione dell'espressione delle proteine corrispondenti ai geni bersaglio del miR-221. Sono riportate le immagini dei risultati ottenuti dall'analisi Western Blot, per valutare l'espressione delle proteine codificate dai potenziali geni bersaglio del miR-221. Le dimensioni delle proteine sono: RB1, 106 KDa; WEE1, 90 KDa; APAF1, 130 KDa; ANXA1, 35 KDa; β -actina, 45 KDa. Le bande ottenute sono state quantificate mediante il software ImageJ e il valore ottenuto per ogni banda (proporzionale all'intensità) è stato rapportato al valore della banda della β -actina del campione corrispondente. I valori ottenuti sono stati ulteriormente normalizzati sull'espressione del campione di controllo. I livelli finali di espressione normalizzati sono indicati nelle tabelle accanto alle immagini.

A. Bande ottenute dalle analisi effettuate sugli estratti proteici delle cellule SNU-398 e HepG2 transfettate con NC2 (controllo negativo) e con miR-221. Il miR-221 provocava diminuzione dell'espressione di tutte le proteine considerate, rispetto al controllo.

B. Bande ottenute dall'analisi effettuata sui campioni di SNU-398/miR-221 transfettati con anti-miR-221 o trattati solo con lipofectamina, come controllo negativo. Le cellule transfettate con anti-miR-221 mostravano un aumento dell'espressione delle proteine in analisi.

Creazione di un topo transgenico in grado di sovra-esprimere miR-221 nel fegato.

Gli esperimenti effettuati *in vitro*, uniti ai risultati ottenuti in precedenza da altri ricercatori, mettono in evidenza il ruolo di del miR-221 nella tumorigenesi epatica. Inoltre lo studio di alcuni suoi potenziali geni bersaglio, coinvolti in vie di segnale cellulari frequentemente alterate nei tumori, aiutano a comprendere i meccanismi molecolari alla base dell'azione patogenetica del microRNA. Tuttavia, per consolidare le evidenze sperimentali ottenute mediante gli studi *in vitro* riguardo il ruolo oncogenico del miR-221, è necessario studiare gli effetti del microRNA in modelli *in vivo*. Per questo motivo abbiamo creato un topo transgenico in grado di sovra-esprimere miR-221 nel fegato, utile sia ad indagare gli effetti oncogenici della sovra-espressione del miR-221, sia a testare l'efficacia antitumorale di molecole in grado di bloccare l'azione del microRNA .

Allo scopo di creare il topo transgenico, è stato preparato un costrutto contenente il gene che codifica per il miR-221 murino (mmu-miR-221), sotto il controllo di un promotore fegato-specifico. È stato scelto come vettore il plasmide pWhere (Invivogen), studiato appositamente per favorire l'espressione di transgeni *in vivo*, in quanto contiene delle sequenze *H19 insulators* adiacenti al sito di clonaggio, che permettono di isolare la cassetta genica clonata da eventuali effetti posizionali legati all'integrazione del plasmide nel genoma della cellula. Il gene codificante per il miR-221 è stato amplificato mediante PCR da un genoma di topo e clonato nel vettore pWhere, utilizzando i siti di restrizione SmaI e NcoI. Successivamente, per garantire che il transgene si esprimesse solo negli epatociti, era necessario clonare un elemento promotoriale fegato-specifico a monte del gene codificante per il miR-221. A tale scopo sono state individuate due sequenze promotoriali, la cui combinazione è stata testata e descritta da Kramer e colleghi(76): il promotore del gene $\alpha 1$ -antitripsina ($\alpha 1$ AT) e la sequenza *enhancer* II del virus dell'epatite B (EII). Entrambi questi elementi costituiscono sequenze promotoriali attive esclusivamente negli epatociti, in quanto il gene dell' $\alpha 1$ -antitripsina è espresso principalmente nelle cellule di fegato e il virus dell'epatite B ha tropismo epatico. Al fine di testare la sua efficacia e specificità, l'elemento EII- $\alpha 1$ AT è stato clonato nel plasmide pGL3 Control (Promega) a monte del gene codificante per la luciferasi, in modo da regolarne l'espressione. Il costrutto è stato transfettato in linee cellulari HepG2, derivate da epatocarcinoma, H460, derivate da carcinoma polmonare e in una linea cellulare

embrionale murina, NIH3T3. Dopo 24h dalla transfezione è stato effettuato un saggio luciferasico e i risultati hanno dimostrato che l'enzima luciferasi veniva espresso in misura significativamente maggiore nelle cellule HepG2 transfettate con pGL3-EII- α 1AT, rispetto alle stesse cellule transfettate con il vettore vuoto ($p = 0,0002$). Questo incremento dell'attività del gene reporter sotto il controllo della sequenza promotoriale non si aveva invece nelle alle altre due linee non epatiche, ad indicare che la sequenza EII- α 1AT era riconosciuta da fattori trascrizionali specifici delle cellule del fegato ed era in grado di indurre l'espressione del gene reporter a valle (**Figura 12**).

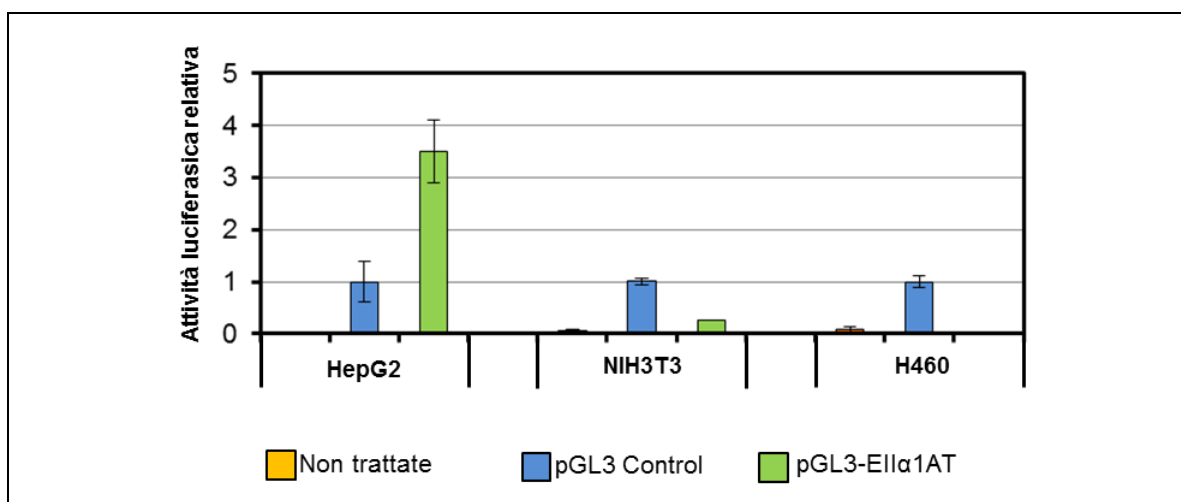


Figura 12. Valutazione dell'efficacia e della specificità dell'elemento promotoriale EII- α 1AT. Cellule HepG2 (derivate da epatocarcinoma umano), NIH3T3 (cellule embrionali di topo) e H460 (derivate da carcinoma polmonare umano) sono state transfettate con il costrutto pGL3-EII- α 1AT e con il vettore vuoto (pGL3 Control). L'aumento dell'attività luciferasica relativa è stato riscontrato soltanto nelle cellule HepG2 transfettate con il costrutto contenente la sequenza promotoriale, rispetto alle cellule transfettate con pGL3 Control vuoto. Nelle altre linee non epatiche la sequenza promotoriale non induceva alcun aumento dell'attività luciferasica.

Dopo aver dimostrato la specificità epatica dell'elemento promotoriale, la sequenza EII- α 1AT è stata clonata nel plasmide pWhere-miR-221, a monte del gene codificante per il microRNA, utilizzando i siti di restrizione XhoI e SmaI (**figura 13A**). Al fine di testare l'efficacia del costrutto ottenuto, il pWhere-EII- α 1AT-miR-221 è stato transfettato in cellule SNU-398 e dagli RNA ottenuti dopo 48h dalla transfezione, è stato valutato il livello di espressione del miR-221. Il grafico in **figura 13B**, mostra che nelle cellule transfettate con il costrutto, il miR-221 aveva un'espressione circa 2 volte maggiore rispetto alle cellule non transfettate ($p = 0,0022$), dimostrando che il costrutto pWhere-EII- α 1AT-miR-221 era in grado di indurre espressione del miR-221 nelle cellule

epatiche. Il plasmide è stato quindi linearizzato mediante l'enzima di restrizione PacI e il frammento purificato contenente il transgene è stato microiniettato in ovociti fecondati di topo B6D2F2 (questa procedura e lo sviluppo dei topi transgenici sono stati effettuati da *Transgenic and Gene Targeting Facility* del Kimmel Cancer Center - Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, USA). I topi ottenuti, aventi il transgene in eterozigosi, sono stati incrociati più volte tra loro, fino ad ottenere una progenie omozigote di topi transgenici.

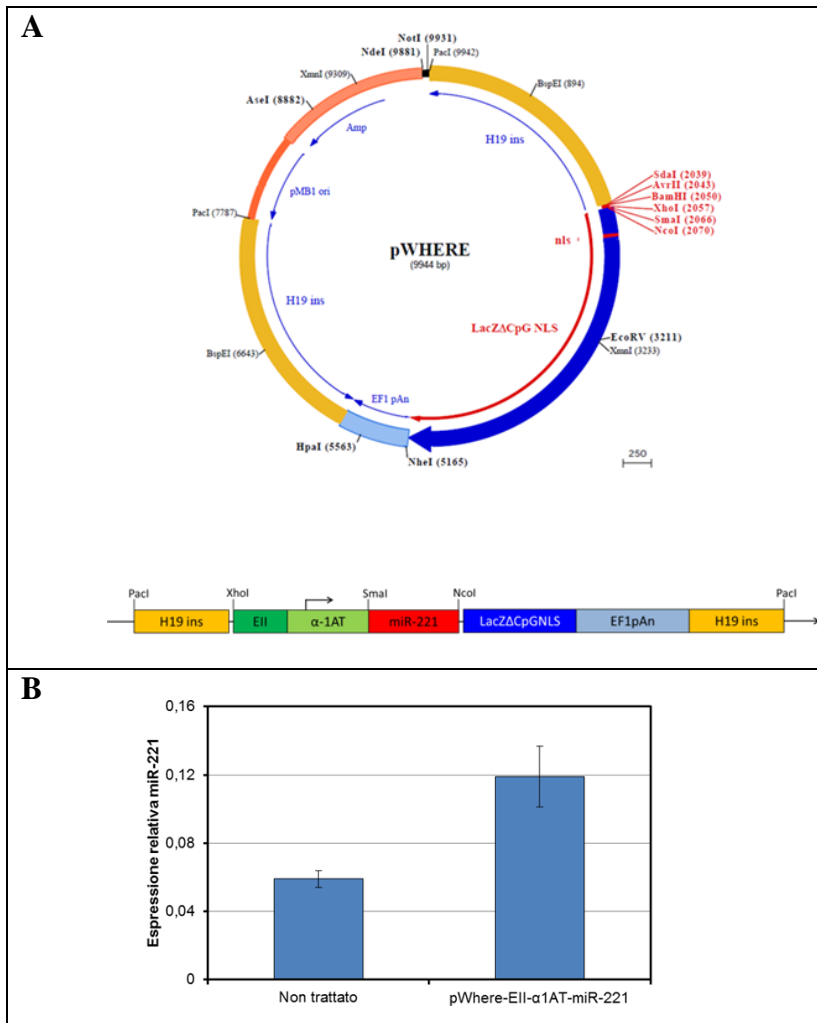


Figura 13. Creazione del vettore di espressione del miR-221, necessario per ottenere i topi transgenici.

A. La figura mostra il vettore pWhere (InvivoGen) utilizzato e le cassette promotoriali (EII- α 1AT) e geniche (mmu-miR-221) clonate all'interno. H19 sono le sequenze *insulators*, LacZ Δ CpG-NLS codifica per il gene della β -galattosidasi, privato delle sequenze CpG, EF1pAn è la sequenza di poliadenilazione.

B. L'istogramma mostra il livello di espressione del miR-221 in cellule SNU-398 transfettate con pWhere-EII- α 1AT-miR-221. Il costrutto era efficace, in quanto induceva significativo aumento dell'espressione del microRNA nelle cellule in cui era stato transfettato, rispetto alle cellule di controllo.

Caratterizzazione molecolare del fegato dei topi transgenici

I topi transgenici sono stati sacrificati dopo 9 e 12 mesi di vita e da ognuno di essi è stato prelevato il fegato. Gli RNA ottenuti dai campioni epatici sono stati analizzati al fine di misurare i livelli di espressione del miR-221. L'espressione epatica del microRNA in tutti gli animali transgenici analizzati era sempre significativamente superiore a quella dei topi di controllo *wild type* della stessa età. L'espressione di miR-221 nei topi transgenici aumentava in media di circa il 50% negli animali più giovani ($p = 0,0416$), mentre dopo un anno di età si riscontrava un aumento medio dell'80% rispetto ai topi *wild type* ($p = 0,0015$) (**Figura 14A**). Questi dati hanno confermato che il transgene era presente ed era effettivamente in grado di esprimersi nel fegato dei topi transgenici.

I fegati degli animali transgenici sono stati valutati macroscopicamente, al fine di individuare se la sovra-espressione del microRNA provocasse variazioni anatomiche. Questi fegati apparivano più voluminosi e pesanti, rispetto a quelli dei topi *wild type*; la massa epatica media dei topi transgenici a 6 mesi di età aumentava di quasi 20% in più rispetto alla massa media misurata nei topi *wild type* della stessa età ($p = 0,01$) (**Figura 14B**).

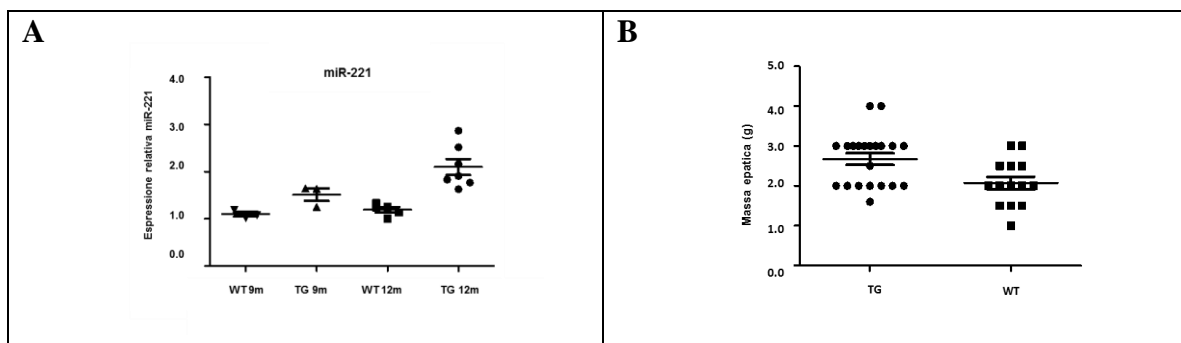


Figura 14. Caratterizzazione macroscopica, istologica e molecolare dei tessuti di fegato transgenici.

A. Il grafico mostra i dati dell'analisi effettuata sugli RNA estratti dai tessuti di fegato dei topi transgenici (TG) e *wild type* (WT) di 9 e 12 mesi di età. L'espressione del miR-221 è stata misurata mediante PCR Real Time e normalizzata sul valore di espressione di SNORNA412. Il miR-221 era significativamente più espresso nel fegato degli animali transgenici, rispetto ai controlli e l'incremento era più evidente negli animali più anziani.

B. Il grafico mostra il confronto tra le masse dei fegati dei topi transgenici e *wild type*. Si nota un aumento del 20% nella massa media dei fegati transgenici, rispetto ai controlli.

Una volta confermato che il miR-221 era effettivamente sovra-espresso nel fegato dei topi transgenici, era necessario valutare se il microRNA fosse biologicamente attivo nelle cellule epatiche. A tale scopo dai tessuti epatici di 5 topi transgenici e 3 topi *wild type*, sono state estratte le proteine ed è stato valutato il livello di espressione di alcuni già noti e validati bersagli genici del miR-221: Cdkn1b/p27, Cdkn1c/p57 (61) e Bmf (62). I risultati hanno dimostrato che c'era diminuzione nell'espressione di tutte e tre le proteine nei tessuti transgenici, rispetto a quelli *wild type*. In particolare l'espressione delle proteine p27 e Bmf diminuiva in modo significativo ($p < 0,03$) di più del 50%, mentre il dato per p57 non era significativo, tuttavia l'espressione della proteina era mediamente più bassa nei fegati transgenici (**Figura 15A**). Come ulteriore conferma, l'espressione della proteina p27 è stata valutata anche mediante colorazione immunostochimica, effettuata sui tessuti epatici dei topi transgenici e *wild type*. Dalla **figura 15B** si nota che la proteina era espressa nei nuclei degli epatociti del topo *wild type*, mentre in quelli del topo transgenico l'espressione era quasi completamente persa. Infine è stata effettuata un'analisi microarray per valutare l'espressione genica dei due tipi di tessuti epatici e i risultati ottenuti confermano che c'erano notevoli differenze tra il pattern di espressione genica del fegato transgenico e quello *wild type* (**Figura 16**).

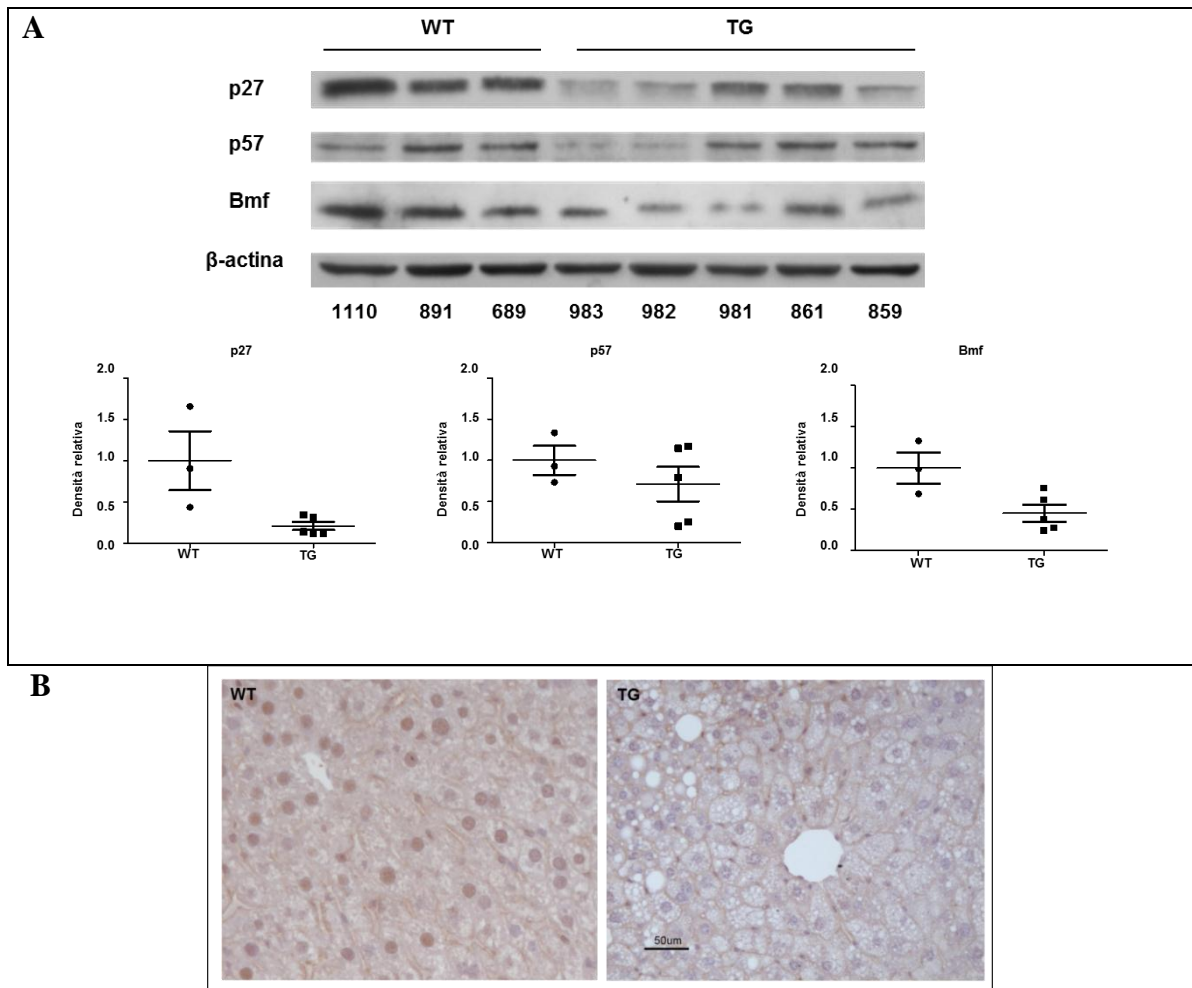


Figura 15. Caratterizzazione molecolare del fegato transgenico.

A. Western Blot per valutare l'espressione di p27 (27 KDa), p57 (57 KDa) e Bmf (21 KDa), geni bersaglio di miR-221. Le bande ottenute sono state quantificate mediante il software ImageJ e il valore ottenuto per ogni banda (proporzionale all'intensità) è stato rapportato al valore della banda della β -actina del campione corrispondente. I valori ottenuti sono stati ulteriormente normalizzati sull'espressione media dei campioni di controllo. I livelli di espressione così normalizzati sono stati riportati nei grafici sotto l'immagine delle bande, che mostrano la loro distribuzione, la media e la deviazione standard. L'espressione di tutte queste proteine diminuiva nei fegati transgenici, rispetto ai controlli.

B. Colorazione immunohistochimica per valutare l'espressione della proteina p27. Mentre nelle cellule del fegato *wild type* p27 era visibile chiaramente a livello nucleare, negli epatociti transgenici la proteina era quasi completamente assente.

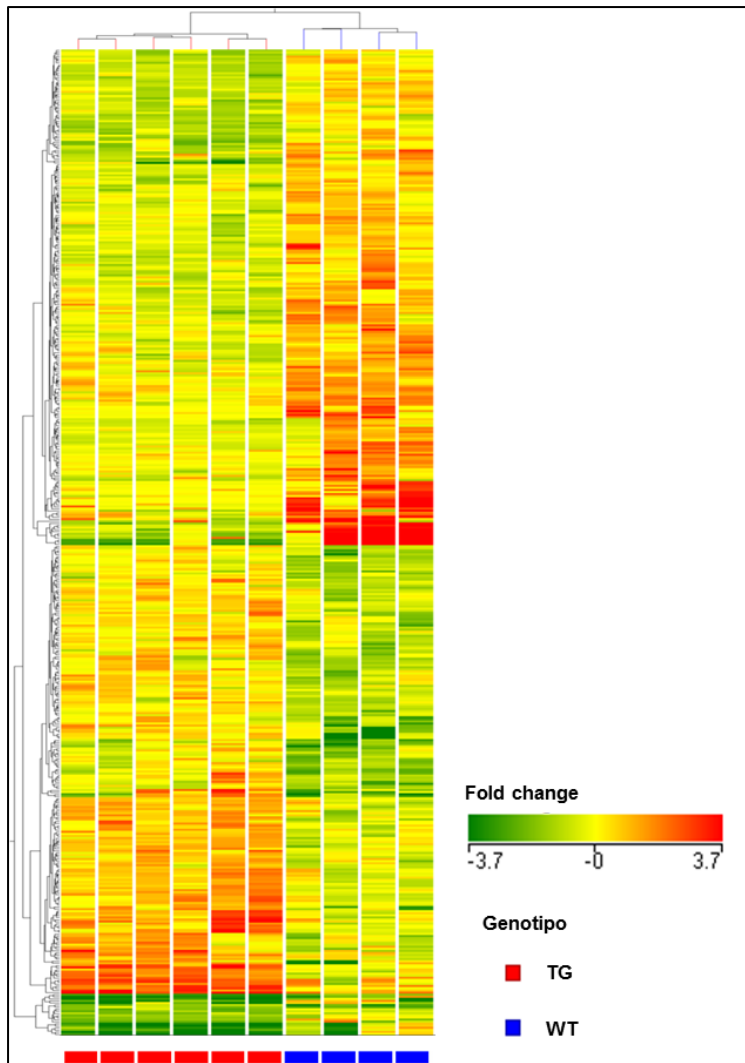


Figura 16. Confronto tra il pattern di espressione genica del fegato dei topi transgenici e *wild type*.

Cluster dell'espressione genica (473 geni) di 6 campioni di fegato transgenico e 4 *wild type*. Le bande colorate rappresentano il valore di espressione normalizzato di ogni gene: le linee verdi indicano bassa espressione, quelle rosse alta espressione. I due gruppi di campioni mostrano pattern di espressione genica molto diversi.

I topi transgenici svilupparono tumori epatici sovra-espressanti miR-221

I dati finora presentati dimostrano che il miR-221 era presente nelle cellule epatiche del topo transgenico ed era biologicamente attivo, in quanto era in grado di modulare l'espressione genica e proteica delle cellule. Gli animali transgenici costituivano perciò un buon modello per studiare gli effetti della sovra-espressione del miR-221 nel fegato. I topi transgenici sono stati monitorati fino a 12 mesi di vita, per vedere se fossero maggiormente predisposti allo sviluppo di tumori epatici rispetto ai topi *wild type*. Gli animali sono stati sacrificati dopo 3, 6, 9 e 12 mesi di vita e il tessuto epatico è stato osservato macroscopicamente al fine di individuare lesioni neoplastiche. Abbiamo riscontrato che nessuna femmina sviluppava epatocarcinoma; al contrario nel 50% dei topi transgenici maschi con almeno 9 mesi di vita si aveva insorgenza spontanea di noduli

neoplastici, mentre nei topi di controllo non si notava alcuna lesione tumorale. Dagli epatocarcinomi sono stati prelevati RNA e proteine; abbiamo dimostrato che il miR-221 era sovra-espresso nei tumori rispetto al fegato sano dei topi transgenici ($p = 0,05$), mentre la proteina p27 era significativamente meno espressa nei tumori, rispetto ai tessuti sani ($p = 0,0125$), a conferma della persistente efficacia dell'azione del miR-221 nei tumori sviluppati (**Figura 17**).

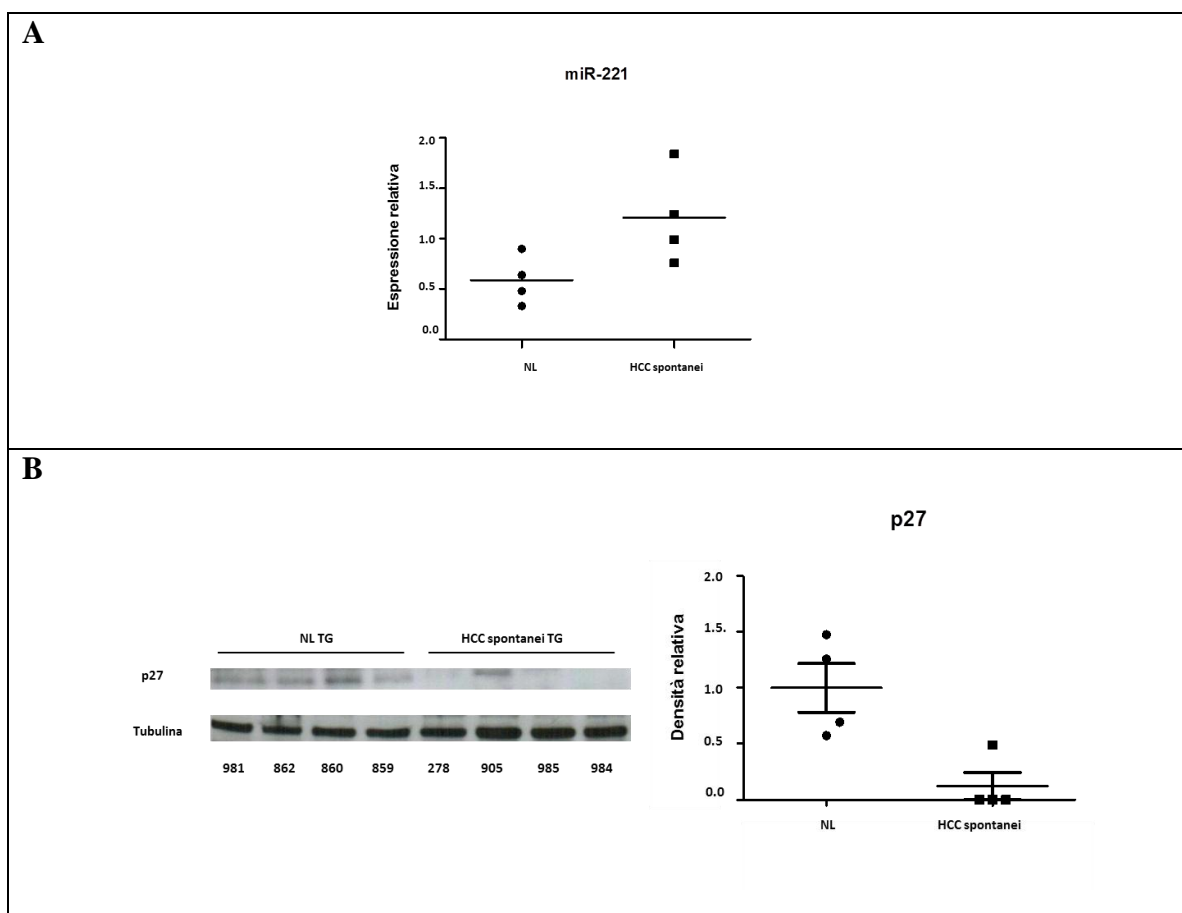


Figura 17. Caratterizzazione molecolare dei tumori comparsi spontaneamente nei topi transgenici.

A. L'espressione del miR-221 è stata misurata mediante PCR Real Time e normalizzata sul valore di espressione di SNORNA412. I tumori (HCC) esprimevano miR-221 in quantità significativamente maggiore rispetto al fegato sano (NL) dei topi transgenici.

B. Western Blot per valutare l'espressione di p27 (27 KDa). Le bande sono state quantificate con il software ImageJ e normalizzate sull'espressione della tubulina (50 KDa) per ogni campione. I valori normalizzati sono riportati nel grafico a fianco. La proteina bersaglio di miR-221 diminuiva significativamente nei tumori, rispetto ai tessuti sani.

Abbiamo visto che il topo sovra-esprimente miR-221 nel fegato era predisposto allo sviluppo di tumori epatici, tuttavia era necessario attendere almeno 9 mesi dalla nascita dell'animale per vedere comparire le prime neoplasie spontanee nei topi di sesso maschile. Al fine di accelerare la comparsa tumorale, i topi transgenici e *wild type* a 10 giorni d'età sono stati trattati con il carcinogeno di-etil-nitrosamina (DEN), mediante iniezione intra-peritoneale (7,5 mg/kg). Dopo 3, 4 e 6 mesi gli animali sono stati sacrificati per valutare la presenza di tumori epatici. Abbiamo riscontrato aumentata insorgenza tumorale in tutti i topi, di tutte le età, ma il fenomeno era più evidente negli animali transgenici. Tutti gli animali maschi di 6 mesi di età riportavano numerose lesioni neoplastiche tuttavia i topi transgenici mostravano un numero maggiore di tumori e di dimensioni più estese rispetto ai controlli *wild type* ($p = 0,0058$); inoltre, a fronte di un significativo aumento della massa epatica ($p = 0,0045$), dovuta all'elevato numero di neoplasie, i topi transgenici mostravano significativa diminuzione nel peso corporeo, rispetto ai controlli ($p = 0,0049$) (**Figura 18**). In seguito al trattamento con DENA anche le femmine transgeniche sviluppavano neoplasie epatiche, riscontrabili non prima di 9 mesi di età. Al contrario nelle femmine *wild type* della stessa età trattate con DENA non si evidenziava alcuna insorgenza neoplastica.

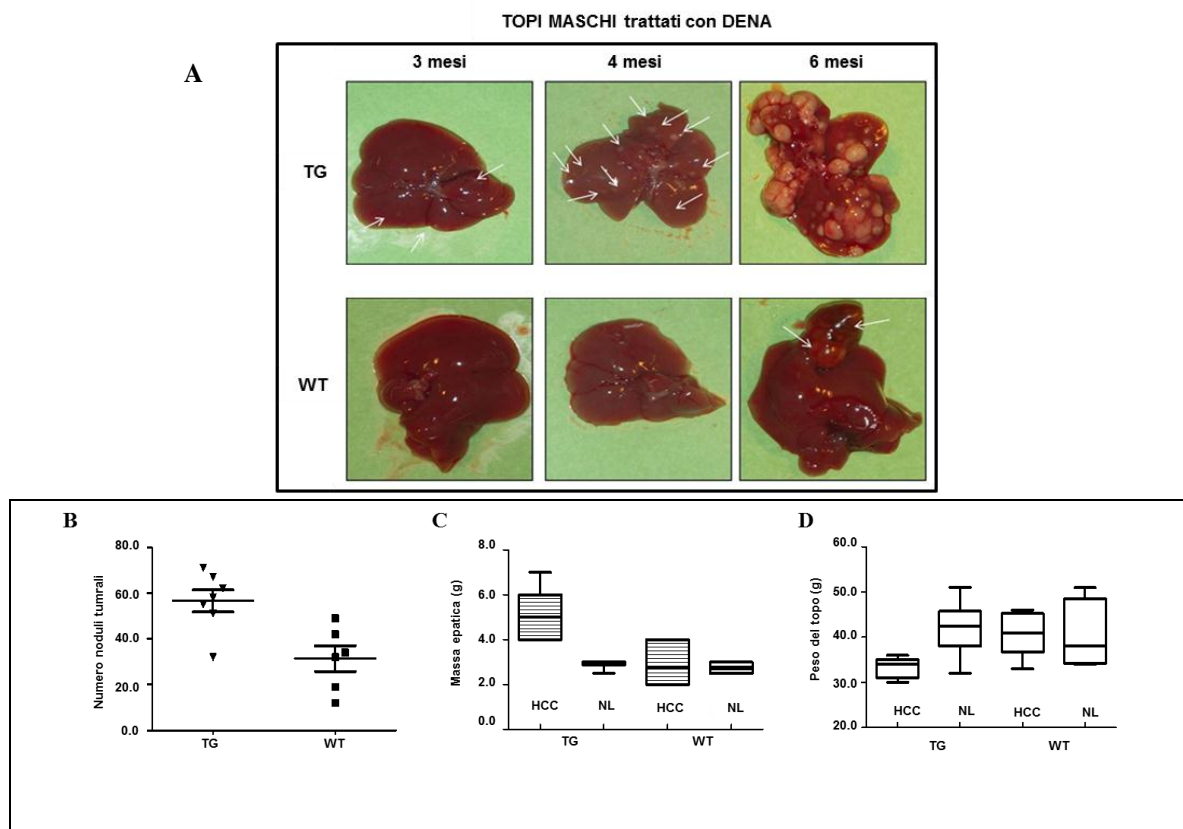


Figura 18. Valutazione dell'insorgenza di tumori epatici nei topi transgenici e *wild type* trattati con DENA.

A. Il pannello mostra foto di fegati di topi maschi, transgenici e *wild type*, della stessa età a confronto. Tutti gli animali erano stati trattati con DENA, dopo 10 giorni dalla nascita e sacrificati dopo 3, 4, 6 mesi. In tutti i casi i fegati dei topi transgenici mostravano un maggior numero di lesioni neoplastiche, rispetto ai controlli.

I grafici mostrano il numero dei noduli tumorali (**B**), la massa epatica (**C**) e il peso (**D**) dei topi maschi, transgenici e *wild type* a confronto, entrambi trattati con DENA. I transgenici mostravano un significativo aumento del numero di noduli neoplastici e un significativo incremento nella massa epatica rispetto ai controlli; al contrario, il peso dei topi transgenici era significativamente inferiore.

Dal punto di vista molecolare, tutti i tumori evidenziavano un aumento dell'espressione del miR-221 e una conseguente diminuzione dell'espressione delle proteine codificate dai suoi geni bersaglio (Cdkn1b/p27, Cdkn1c/p57) ($p < 0,0085$). Inoltre l'analisi dell'espressione di altri microRNA frequentemente deregolati nel tumore epatico umano ha delineato un pattern di espressione nei tumori murini molto simile a quello dell'epatocarcinoma umano: miR-21 è stato ritrovato sovra-espresso, mentre miR-199 e miR-122 erano sotto-espressi ($p < 0,007$) (**Figura 19**).

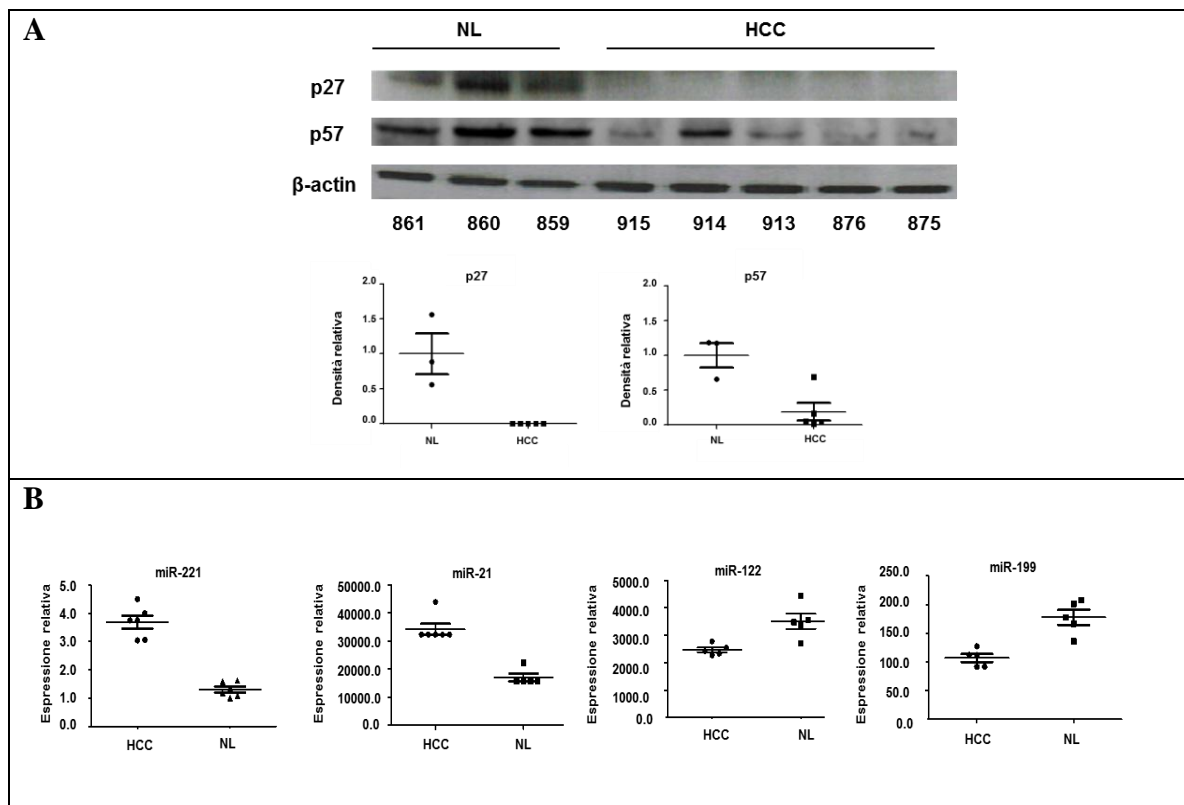


Figura 19. Caratterizzazione molecolare dei tumori sviluppati dai topi transgenici.

A. Risultati delle analisi Western Blot per valutare l'espressione di alcune proteine bersaglio del miR-221 (p27, p57) negli epatocarcinomi sviluppati dai topi transgenici. Le bande ottenute sono state quantificate mediante il software ImageJ e normalizzate sulla base dell'espressione di β -actina; i risultati sono illustrati nei grafici sottostanti. Entrambe le proteine bersaglio del miR-221 erano significativamente sotto-esprese negli HCC, rispetto ai campioni di fegato sano (NL).

B. I quattro grafici mostrano i livelli di espressione di miR-221, miR-21, miR-122 e miR-199, quattro microRNA la cui espressione è frequentemente alterata nell'epatocarcinoma umano. miR-221 e miR-21 sono risultati significativamente sovra-espressi negli HCC murini ($p < 0,0001$), mentre miR-122 e miR-199 erano significativamente sotto-espressi ($p < 0,007$), rispetto ai campioni di fegato sano (NL), analogamente a quanto avviene negli epatocarcinomi umani.

La somministrazione di anti-miR-221 era in grado di contrastare gli effetti del miR-221 e di inibire la tumorigenesi nei topi transgenici

Per confermare che miR-221 fosse responsabile della predisposizione dei topi transgenici all'insorgenza di epatocarcinomi, abbiamo bloccato l'azione del microRNA mediante l'utilizzo dell'oligonucleotide anti-miR-221, come già descritto in precedenza(77). In tre topi transgenici trattati con DENA, a 2 mesi di età è stato iniettato l'oligonucleotide anti-miR-221 (10 mg/kg) attraverso la vena caudale. Dopo 48 ore i topi sono stati sacrificati e

sono stati valutati i livelli di miR-221 nel fegato e nel plasma. I risultati riportati in **figura 20** mostrano che c'era un abbassamento significativo dei livelli di miR-221 sia nel fegato ($p = 0,0048$) che nel plasma ($p = 0,033$) dei topi trattati con anti-miR-221. A conferma del dato, l'espressione epatica della proteina p27 risultava significativamente aumentata nel fegato dei topi in cui l'oligonucleotide era stato iniettato ($p = 0,0080$), ad indicare che l'anti-miR-221 era in grado di contrastare gli effetti del suo microRNA bersaglio.

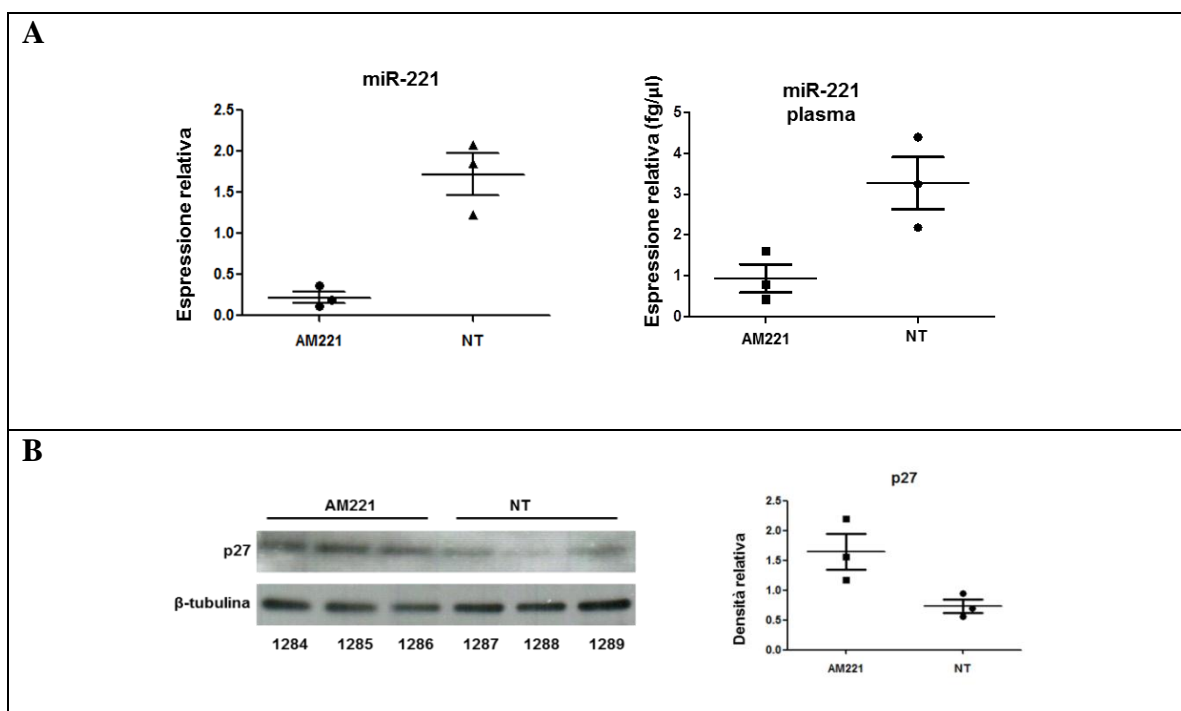


Figura 20. Valutazione dell'efficacia dell'oligonucleotide anti-miR-221 in vivo.

A. Livello di espressione di miR-221 nel fegato (istogramma a sinistra) e nel plasma (istogramma a destra) di topi transgenici trattati con anti-miR-221 (AM221) o non trattati (NT). La somministrazione di anti-miR-221 provocava una diminuzione significativa dei livelli epatici e plasmatici di miR-221.

B. Risultati delle analisi Western Blot per valutare l'espressione di p27 nei campioni di fegato dei topi transgenici trattati con anti-miR-221 (AM221) e non trattati (NT). Le bande ottenute sono state quantificate mediante il software ImageJ e normalizzate sull'espressione della tubulina; i risultati sono illustrati nel grafico a fianco. La proteina p27 era significativamente sovra-espressa nel fegato dei topi trattati con anti-miR-221.

Dimostrata l'efficacia dell'anti-miR-221 nel contrastare gli effetti molecolari del microRNA in vivo, l'oligonucleotide è stato iniettato in altri topi transgenici, al fine di valutare una sua potenziale efficacia anti-tumorale. L'anti-miR (10 mg/kg) è stato iniettato in cinque topi (precedentemente trattati con DENA) in tre diverse somministrazioni, a 60, 75, 90 giorni d'età e i topi sono stati sacrificati all'età di 120 e 150 giorni. I fegati dei topi in cui era stato iniettato l'anti-miR-221 mostravano una

significativa riduzione nel numero e nella dimensione dei noduli neoplastici ($p = 0,0027$), rispetto al fegato dei topi transgenici trattati solo con DENA, usati come controllo. Inoltre i tumori sviluppati dai topi trattati con anti-miR mostravano livelli di miR-221 significativamente più bassi rispetto ai tumori dei topi di controllo ($p = 0,0005$), ad indicare la persistenza e l'efficacia dell'anti-miR-221 nel fegato dei topi, in grado di contrastare l'insorgenza tumorale (**Figura 21**).

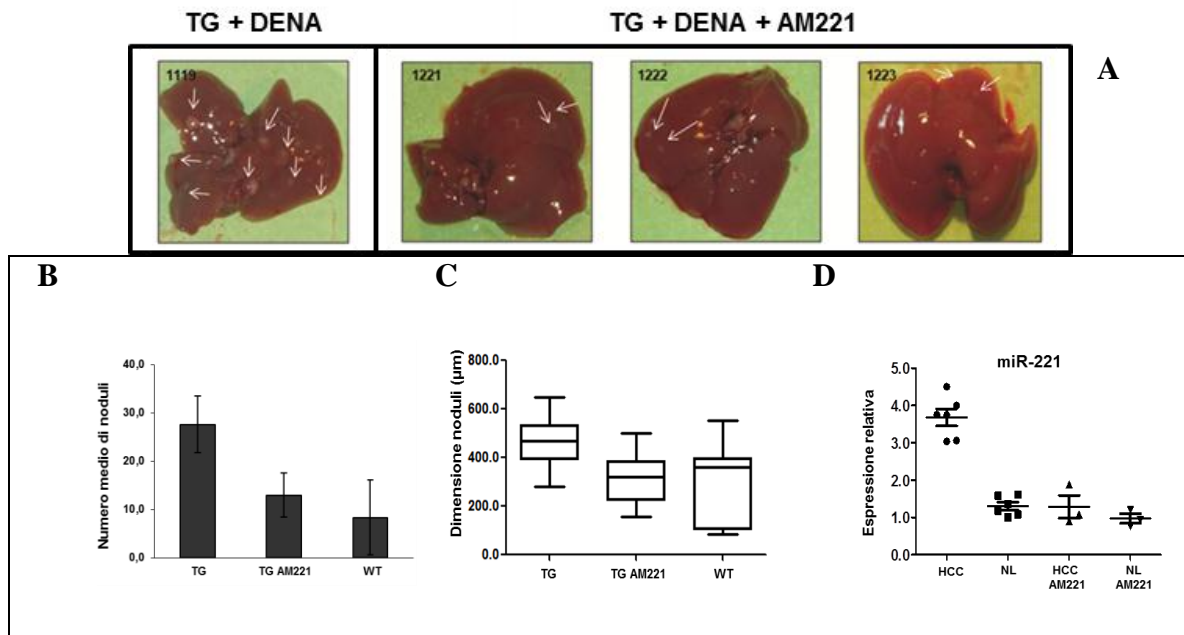


Figura 21. Effetti della somministrazione dell'oligonucleotide anti-miR-221 sulla tumorigenesi epatica.

A. Le fotografie mostrano i fegati di topi transgenici maschi, trattati con DENA e sacrificati dopo 4 mesi di età. Il primo fegato apparteneva al topo di controllo, trattato solo con DENA, i tre successivi appartenevano a topi trattati con DENA e con anti-miR-221. Il numero di noduli neoplastici nei fegati dei topi trattati con DENA e anti-miR-221 era significativamente inferiore rispetto a quello dei topi transgenici trattati solo con DENA e risultava solo di poco superiore al numero dei tumori riscontrati nei topi *wild type* trattati con il carcinogeno (grafico in figura **B**).

C. Il grafico rappresenta la dimensione dei noduli neoplastici riscontrati nei topi transgenici trattati con DENA e anti-miR-221 (AM221), transgenici, trattati con DENA (TG) e nei *wild type* trattati con DENA (WT). L'anti-miR causava una significativa diminuzione nella dimensione dei noduli tumorali, rispetto ai topi transgenici trattati solo con il carcinogeno.

D. Il grafico rappresenta i livelli di miR-221 nei campioni di epatocarcinoma (HCC) e fegato sano (NL), di topi transgenici trattati con DENA e con/senza anti-miR-221. L'anti-miR-221 (AM221) era efficace in quanto causava un significativo abbassamento dei livelli di miR-221 negli epatocarcinomi, riportandone l'espressione agli stessi livelli riscontrati nel fegato sano dei topi.

DISCUSSIONE

In questo lavoro è stato dimostrato che il miR-221 è in grado di favorire la tumorigenesi epatica, sia mediante un approccio *in vitro*, legato all'identificazione di nuovi geni bersaglio del microRNA coinvolti in vie cellulari pro-proliferative e anti-apoptotiche, che mediante lo studio *in vivo* degli effetti della sovra-espressione epatica del miR-221, effettuati su un topo transgenico da noi creato.

Il coinvolgimento del miR-221 nella tumorigenesi umana è noto e studiato già da alcuni anni. Infatti l'osservazione che il microRNA è sovra-espresso in quasi tutti i tumori umani di derivazione epiteliale ne suggerisce un importante ruolo nei processi neoplastici. Per quanto riguarda l'epatocarcinoma, diversi studi hanno dimostrato che il miR-221 è significativamente sovra-espresso in questo tipo di tumore, rispetto al fegato sano(60-62). Questo dato è stato riconfermato anche nella casistica clinica di 70 campioni epatici analizzata in questo studio, in cui è stata ritrovata una sovra-espressione del miR-221 nel 78,9% degli epatocarcinomi, rispetto ai campioni di fegato sano; sovra-espressione del microRNA è stata riscontrata anche nel 29,2% dei campioni cirrotici. Inoltre la valutazione dell'espressione del microRNA in coppie di campioni (cirrosi e epatocarcinoma) derivati dagli stessi pazienti, ha permesso di valutare come variasse la sua espressione nel corso dell'evoluzione da lesione pre-neoplastica a neoplasia. È stato riscontrato che il microRNA era significativamente sovra-espresso nel tumore nell'84,6% dei casi analizzati e ciò significa che l'espressione aberrante del microRNA veniva acquisita progressivamente nella transizione fegato sano-cirrosi-epatocarcinoma, in accordo con quanto riscontrato da Pineau(60). Una sovra-espressione del miR-221 nelle cirrosi, rispetto a campioni di fegato sano era stata riscontrata anche in un precedente studio(47). I dati da noi ottenuti, in accordo con quanto precedentemente dimostrato, lasciano intuire che l'aberrante espressione del microRNA giochi un ruolo cruciale sia nell'acquisizione di un fenotipo pre-neoplastico, contribuendo all'insorgenza della cirrosi, che nel processo di trasformazione tumorale. Inoltre è stato dimostrato da altri che l'espressione del miR-221 correlava con l'aggressività della neoplasia epatica: Li ha osservato che epatocarcinomi di stadio TNM più avanzato mostravano spesso un'alta espressione di miR-221(67), mentre Gramantieri e colleghi hanno riscontrato una maggiore espressione del microRNA in neoplasie epatiche multifocali e in pazienti con ridotto intervallo libero da malattia(62), ad indicare che la sovra-espressione del

microRNA contribuisce a tutte le fasi della tumorigenesi epatica, da quelle iniziali, fino a quelle più avanzate, legate alla progressione verso fenotipi tumorali più aggressivi .

Al fine di meglio chiarire i meccanismi molecolari alla base dell'azione oncogenica del miR-221, sono stati identificati già diversi geni bersaglio del miR-221 e tra questi ci sono geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare e dell'apoptosi. La necessità di chiarire ulteriormente la funzione fisiologica, ma soprattutto patologica del miR-221, spinge alla ricerca di nuovi bersagli genici. A tale scopo, in questo lavoro è stato utilizzato un approccio innovativo, diverso da quello comunemente usato per l'identificazione dei geni bersaglio dei microRNA, che ha permesso di incrociare i risultati sperimentali con quelli predittivi. I dati di espressione genica ottenuti confrontando campioni in cui era stata indotta la sovra-espressione del miR-221 e i relativi controlli negativi, sono stati ordinati in base al *fold change* e sono stati analizzati mediante il programma Sylamer per individuare la presenza di sequenze bersaglio dei microRNA nei geni considerati. È stato molto interessante in questo caso vedere che, nella lista di geni fornita come input, Sylamer individuava significativa presenza di sequenze complementari alla *seed sequence* del miR-221, in corrispondenza dei primi geni della lista, ad indicare che effettivamente i geni maggiormente sotto-espresi nelle cellule transfettate con miR-221 contenevano nel loro 3'UTR una o più sequenze bersaglio del miR-221. Il programma Sylamer, messo a punto da Dongen e colleghi nel 2008, è stato creato appositamente per individuare i geni bersaglio dei microRNA e gli effetti *off-target* dei siRNA, partendo da dati di espressione genica(78). Il suo utilizzo ha permesso di determinare il coinvolgimento dei clusters dei miR-302 e miR-371-373 nei tumori maligni derivati dalle cellule germinali(78) e che le cellule endoteliali di diversa derivazione tissutale erano caratterizzate da differente espressione dei miR-99b, miR-20b e let-7b(79).

Al fine di identificare una lista di potenziali geni bersaglio del miR-221, è stato scelto un cut-off arbitrario sulla base del *fold change* e della distribuzione individuata da Sylamer e, all'interno di questa soglia, sono stati identificati 602 geni che contenevano nel loro 3'UTR almeno una sequenza bersaglio per il microRNA. L'affidabilità della metodica è stata provata dal fatto che dei 32 geni bersaglio del miR-221 già validati in passato, quasi il 40% era presente nel gruppo di geni individuato; se si fosse scelta una soglia meno stringente, sarebbero potuti rientrare nel gruppo altri 5 geni (innalzando la percentuale di predizione oltre il 50%). Il 66% di questi geni bersaglio già validati in precedenza veniva predetto da almeno uno dei tre algoritmi di predizione considerati (MicroCosm,

TargetScan, Diana MicroT) e ciò non stupisce se si pensa che fino ad ora la predizione bioinformatica è uno dei principali mezzi usati come punto di partenza per identificare i potenziali bersagli dei microRNA; tuttavia se avessimo utilizzato questi algoritmi predittivi al posto della strategia basata sull'analisi Sylamer, avremmo individuato soltanto 1/5 dei geni che invece sono stati ottenuti. Questa strategia ha inoltre un valore aggiunto rispetto alle tecnologie puramente bioinformatiche, in quanto i risultati ottenuti derivano non da predizioni teoriche basate su algoritmi matematici, ma da dati sperimentali.

L'identificazione dei 602 geni sotto-espresi nelle cellule transfettate con miR-221 e aventi delle sequenze bersaglio per il miR-221 ha permesso di individuare alcune vie di segnale cellulari in cui questi geni erano coinvolti e la cui attivazione era probabilmente legata all'espressione del miR-221. Dai risultati ottenuti mediante lo specifico algoritmo di GeneSpring GX 11 si notava che la maggior parte delle vie individuate era coinvolta nei processi di proliferazione cellulare e apoptosi. Anche i risultati sperimentali hanno confermato che la sovra-espressione del miR-221 induceva l'attivazione di due vie cellulari che favoriscono la proliferazione cellulare: la via di E2F/RB1 e la via di β -catenina. Diversi studi precedenti hanno dimostrato che la sovra-espressione del miR-221 in diversi tipi cellulari (tra cui cellule derivate da epatocarcinoma) provocava aumento della proliferazione cellulare e diminuzione dell'apoptosi(61) (80) (62, 81) e a conferma di ciò, alcuni dei bersagli già validati di questo microRNA sono geni coinvolti in questi processi: per fare alcuni esempi Cdkn1b/p27, Cdkn1c/p57 e PTEN codificano per proteine che regolano il ciclo cellulare, mentre Bmf e Bbc3/PUMA danno origine a proteine con funzione pro-apoptotica. La via di segnale di β -catenina è una delle vie più frequentemente alterate in cancro. β -catenina fa parte di un complesso di proteine che costituiscono le giunzioni aderenti intercellulari ed è responsabile della regolazione di segnali pro-proliferativi, legati all'adesione tra cellule. Esplica la sua funzione attraverso l'induzione della via di Wnt, che ha come suoi bersagli a valle i fattori di trascrizione oncogeni c-myc e c-jun. Il coinvolgimento di β -catenina nei tumori è noto già da diversi anni ed è descritto che l'attivazione aberrante di questa proteina e della sua via di segnale favoriscono i processi neoplastici in diversi tessuti, tra cui nel fegato (82). Anche Rao e colleghi hanno dimostrato che il miR-221 è in grado di attivare la via di β -catenina in cellule derivate da tumore mammario, contribuendo a indurre proliferazione cellulare anche in presenza di un farmaco chemioterapico(83).

In questo lavoro sono stati validati alcuni nuovi bersagli genici del miR-221, appartenenti alla lista di geni ottenuta in seguito all'analisi Sylamer: RB1, APAF1, ANXA1, WEE1, CTCF. Questi geni sono stati scelti in quanto erano coinvolti in diverse vie di segnale alterate dalla sovra-espressione del miR-221, legate prevalentemente a proliferazione cellulare e apoptosi. Gli RNA messaggeri di questi geni sono risultati sotto-espressi nelle linee cellulari derivate da epatocarcinoma umano, transfettate con il microRNA, e contenevano almeno una sequenza complementare al miR-221 nel loro 3'UTR, indicandoli come candidati bersagli del miR-221. È stato dimostrato in diverse linee cellulari che il microRNA era effettivamente in grado di interagire con il 3'UTR dell'mRNA di tutti i geni in analisi, mentre non interagiva con l'mRNA di FASLG, un altro potenziale bersaglio del miR-221, che aveva nel suo 3'UTR una sequenza complementare al microRNA, ma che non era presente nella lista di geni considerata. Perciò questo risultato conferma nuovamente l'efficacia dell'approccio adottato per la ricerca di nuovi bersagli genici dei microRNA. Oltre a dimostrare l'interazione molecolare tra il miR-221 e l'mRNA dei geni in esame, è stato provato che la sovra-espressione del microRNA provocava calo dell'espressione delle proteine corrispondenti, mentre la transfezione di un oligonucleotide anti-miR-221 in cloni stabili di cellule che sovra-esprimevano costitutivamente miR-221, ripristinava l'aumento dell'espressione delle proteine bersaglio. Questi dati hanno validato i geni in esame come bersagli del miR-221.

Il gene Retinoblastoma1 (RB1) codifica per una proteina coinvolta nella regolazione del ciclo cellulare, in particolare inibisce il passaggio dalla fase G1 alla fase S. Durante la fase G1 questa proteina interagisce con i fattori di trascrizione appartenenti alla famiglia di E2F e complessandosi ad essi, li sottrae alla loro funzione, impedendo di attivare la trascrizione dei loro geni bersaglio, implicati nell'entrata della cellula in fase S. Inoltre è descritto che RB, mediante l'interazione con E2F, può agire anche come diretto repressore trascrizionale, grazie alla sua capacità di reclutare DNA Methyltransferasi (DNMT1) e promuovere la metilazione promotoriale(75). Questa proteina è regolata negativamente da alcune proteine chinasi-ciclina dipendenti (Cdk4, Cdk6 e Cdk2), che, fosforilandola, ne impediscono il legame con E2F. In aggiunta al ben noto ruolo di RB nel provocare blocco del ciclo cellulare, recentemente è stato dimostrato che la proteina è in grado di indurre apoptosi nelle cellule proliferanti, trattate con agenti che provocano danno al DNA, caratterizzando in questo modo un'altra importante funzione anti-

tumorale di RB(84). Proprio per questa sua importante funzione regolatoria, il gene RB1 è uno dei primi geni oncosoppressori scoperti ed è uno dei più studiati, in quanto mutazioni che alterano la funzionalità della proteina sono state ritrovate in moltissimi tipi di tumori umani: nel retinoblastoma, neoplasia in cui il gene è stato indentificato e che è causata dalla perdita di funzione di entrambi gli alleli di RB(85); mutazioni a questo gene predispongono inoltre allo sviluppo di tumori polmonari a piccole cellule(86) e vengono ritrovate anche nell'osteosarcoma(85), nel tumore alla prostata(87), alla vescica, allo stomaco(88), alla mammella(89) e anche nell'epatocarcinoma(90). La proteina RB è soggetta ad inattivazione mediata dalle oncoproteine virali E6/E7 del papilloma virus (HPV), responsabili dell'insorgenza del tumore alla cervice uterina. Inoltre è stato dimostrato che topi $Rb^{+/-}$ sviluppavano tumori neuroendocrini(91). Evidenze sperimentali hanno riscontrato che in alcuni tipi di neoplasie le mutazioni a questo gene sono presenti ad alta frequenza nelle cellule neoplastiche, mentre in altri tipi di neoplasie (come il tumore alla vescica e alla mammella) le anomalie genetiche ad RB hanno minore frequenza, suggerendo che le mutazioni a questo gene siano coinvolte sia nelle prime fasi della trasformazione tumorale, che nella progressione tumorale (92).

Apoptotic protease activating factor 1 (APAF1) è una proteina coinvolta nella via intrinseca dell'apoptosi, una via che viene attivata in seguito a stimoli di morte cellulare, quali danno al DNA, ipossia o deprivazione di nutrienti. Questi stimoli inducono segnali intracellulari che causano un cambiamento nella permeabilità della membrana mitocondriale, provocando il rilascio di citocromo C e ATP dai mitocondri. Il legame di APAF1 a queste due molecole induce dei cambiamenti conformazionali nella proteina, che ne favoriscono l'oligomerizzazione e la formazione del complesso dell'apoptosoma, che è in grado di legare e attivare proteoliticamente la pro-caspasi 9, innescando in questo modo la cascata apoptotica. Il fattore di trascrizione p53, oltre ad essere una delle proteine responsabili dell'innescamento della via intrinseca dell'apoptosi è anche un diretto attivatore trascrizionale di APAF1. Dato il ruolo centrale di APAF1 nell'indurre morte cellulare programmata, il suo coinvolgimento nei tumori come gene oncosoppressore è molto studiato. Nel melanoma, mutazioni a carico di questo gene sono legate a sviluppo di resistenza ad alcuni trattamenti anti-tumorali basati sull'induzione della via di segnale di p53. A conferma di ciò, è stato dimostrato che l'inattivazione di APAF1 apporta un significativo vantaggio di sopravvivenza cellulare alle cellule neoplastiche ed è associata alla progressione tumorale(93). Per quanto riguarda il tumore al colon è stato dimostrato

che l'espressione di APAF1 viene persa nel 80% degli adenocarcinomi e nel 90% dei casi metastatici ed è stata riscontrata un'inversa proporzionalità tra l'espressione della proteina e l'aggressività della patologia, suggerendo l'importante ruolo di APAF1 nella prevenzione della tumorigenesi e della progressione tumorale anche in questo tipo di neoplasia(94).

Annexina A1 (ANXA1) appartiene ad una superfamiglia di proteine, caratterizzate dalla loro capacità di legare i fosfolipidi carichi negativamente, in modo calcio-dipendente. La proteina è in grado di legare molte componenti cellulari, tra cui la membrana plasmatica, le vescicole cellulari e alcune proteine del citoscheletro, suggerendo un suo probabile coinvolgimento nella regolazione dei movimenti intracellulari. Sono descritti coinvolgimenti di questa proteina nei processi differenziativi, proliferativi, di riparazione della membrana cellulare e nell'apoptosi. A livello extracellulare questa proteina è coinvolta nei processi anti-infiammatori. Il suo ruolo nei tumori umani non è ancora completamente chiaro. Sebbene in alcuni tipi di tumori, come la leucemia a cellule capellute, l'espressione di ANXA1 sembri aumentare nella condizione neoplastica(95), tuttavia nella maggioranza dei tumori solidi l'espressione della proteina diminuisce. È stato dimostrato che ANXA1 inibisce la via di segnale di NF- κ B, che favorisce proliferazione e evasione dall'apoptosi e in tal modo ha attività di oncosoppressore (96). Nel tumore mammario è stato dimostrato che la perdita di espressione della proteina si riscontra prevalentemente in neoplasie in stadio avanzato, con presenza di infiltrazione linfonodale e peggiore prognosi; il dato secondo cui l'espressione di ANXA1 correla inversamente con l'aggressività della patologia mammaria è stato dimostrato da diversi gruppi, suggerendo che questa proteina svolga un ruolo importante nello sviluppo, progressione e metastasi in questo tipo di neoplasia(97) (98) (99). Analoga correlazione è stata ritrovata anche in casi di colangiocarcinoma(100). Nel tumore alla prostata ANXA1 è stata inserita in un pannello di 10 geni con valore prognostico, in quanto la diminuzione della sua espressione si associava ad alta probabilità di recidiva nei pazienti soggetti a prostatectomia(101) ed è stato dimostrato che nelle cellule derivate da questo tipo di tumore la proteina svolgeva una funzione pro-apoptotica(102).

WEE1 codifica per una tirosina-chinasi nucleare, che è coinvolta nei meccanismi di sorveglianza del ciclo cellulare in fase G2/M. La sua azione si esplica mediante la fosforilazione inibitoria della chinasi-ciclina-dipendente 1 (Cdk1), responsabile dell'entrata in mitosi della cellula. L'espressione della proteina aumenta fisiologicamente

durante le fasi S e G2 e la sua espressione è importante per evitare che la cellula si divida in presenza di danni al DNA o se c'è aberrante attivazione della Cdk1. In questo modo l'attività di WEE1 previene la morte della cellula, favorendo piuttosto l'azione dei meccanismi di riparazione del danno al DNA(103). Data questa sua importante natura regolatoria, l'espressione della proteina WEE1 viene frequentemente trovata alterata nei tumori umani. Tuttavia il suo ruolo nella tumorigenesi è apparentemente contraddittorio. È stato dimostrato, studiando una linea cellulare derivata da prostata, che queste cellule, predisposte all'insorgenza di carcinoma prostatico, erano caratterizzate da alterazione ai normali meccanismi legati alla sorveglianza del danno al DNA e da ridotta espressione di WEE1; la reintroduzione ectopica di questo gene era sufficiente a ripristinare i normali meccanismi di arresto cellulare in seguito a danno a DNA(104). Analogamente Tili e colleghi hanno dimostrato che il silenziamento genico di WEE1 ad opera dell'oncomiR-155, permetteva alle cellule derivate da diversi tipi di neoplasia di proseguire nel ciclo cellulare anche in presenza di danni al DNA non riparati, causando accumulo progressivo di mutazioni(105). Inoltre in adenomi pituitari sporadici è stata riscontrata una significativa riduzione dei livelli proteici di WEE1(106) ed è stato dimostrato che la ridotta espressione di WEE1 costituisce fattore prognostico negativo nel tumore polmonare non a piccole cellule (107). Questi dati suggeriscono un importante contributo di WEE1 nel prevenire l'accumulo di lesioni genetiche che predispongono alla trasformazione neoplastica. Tuttavia la proteina WEE1 è stata ritrovata anche sovra-espressa in diversi tipi di neoplasie, tra cui il glioblastoma(108) e in alcuni tipi di tumore mammario(109). Questo paradosso può essere spiegato dal fatto che nelle cellule neoplastiche sono presenti numerose mutazioni che favoriscono la proliferazione cellulare, tra cui l'aberrante attivazione delle Cdk; tuttavia, se l'attivazione delle Cdk risulta troppo alta in presenza di danno al DNA, viene indotta la morte cellulare; perciò in una cellula neoplastica l'acquisizione della mutazione a WEE1, che inibisce l'attività delle Cdk, può apportare vantaggio in quanto impedisce alla cellula di andare incontro ad apoptosi. Per questo motivo, il ruolo di WEE1 nei tumori non è ben definito, la stessa proteina può agire sia da oncogene che da oncosoppressore a seconda delle neoplasie e dal tipo di mutazioni che le cellule neoplastiche hanno acquisito.

Il gene CCCTC-binding factor (CTCF) codifica per un fattore di trascrizione che riconosce più di 20000 siti nel genoma umano. I suoi elementi responsivi possono agire da *insulators*, proteggendo i promotori di altri geni, in particolare geni oncosoppressori,

da adiacenti condizioni di blocco trascrizionale (come la metilazione al DNA e le modifiche istoniche). Nonostante inizialmente sia stato identificato come repressore, tuttavia è stato dimostrato che può agire anche da attivatore o come repressore *enhancer*, a seconda della sequenza di DNA a cui si lega e talvolta anche in modo tessuto-specifico. Inoltre questa proteina partecipa anche alla regolazione epigenetica (per es. nell'inattivazione del cromosoma X e nell'imprinting)(110). La proteina CTCF è coinvolta in numerosi processi cellulari, tra cui differenziamento, arresto del ciclo cellulare e senescenza. Il suo diretto coinvolgimento nella modulazione trascrizionale o epigenetica di molti geni legati al cancro, ne delineano un ruolo di oncosoppressore. In particolare è stato dimostrato che CTCF è in grado di inibire l'espressione degli oncogeni c-myc(111), IGF2(112), entrambi coinvolti in vie di segnale pro-proliferative, e hTERT(113), un inibitore delle telomerasi, enzimi responsabili degli eventi che portano a senescenza e morte cellulare. Accanto a ciò, è stata descritto che CTCF induce l'espressione di geni con funzione di oncosoppressori, tra cui RB(114), p53(115) e il gene CDKN2A, che codifica per le proteine p14^{ARF} e p16^{INK4a}(116), coinvolte nella regolazione della progressione del ciclo cellulare e dell'attività di p53. A conferma del ruolo di oncosoppressore della proteina è stato dimostrato che la sovra-espressione di CTCF inibiva la crescita cellulare in diversi tipi di cellule(117) e inoltre alcuni tumori mammari erano caratterizzati dalla perdita di alcuni suoi siti di legame(118).

Da quanto emerso da studi precedenti effettuati sui geni in esame, traspare il coinvolgimento di questi in diversi tipi di neoplasie umane. Tuttavia soltanto il ben noto e studiato gene oncosoppressore RB1 è stato descritto essere frequentemente sotto-espresso in epatocarcinoma, mentre sulle altre proteine oggetto di questo studio non ci sono chiare evidenze riguardo la loro espressione nel tumore epatico. Sarà perciò interessante approfondire lo studio di questi geni, al fine di valutare se ci sono variazioni della loro espressione nei campioni clinici di epatocarcinoma, rispetto ai tessuti sani.

In base a quanto detto riguardo i geni bersaglio validati, si può ipotizzare un quadro approssimativo dei possibili effetti cellulari indotti dall'aberrante sovra-espressione del miR-221: la sovra-espressione del microRNA induce proliferazione cellulare, mediante l'alterazione di alcune vie di segnale intra ed extracellulari, tra cui alcune controllate da Annexina A1 (per esempio la via di NF-κB). La ridotta produzione delle proteine RB1 e WEE1, fa sì che la cellula, perdendo due importanti meccanismi di sorveglianza del ciclo

cellulare, possa rispondere a questi stimoli pro-proliferativi, dividendosi in modo incontrollato, accumulando danni al DNA, senza tuttavia andare incontro ad apoptosi, a causa della sotto-espressione di APAF1. Oltre a ciò, la perdita di CTCF, dovuta agli aumentati livelli di miR-221, provoca anomalie nella regolazione di moltissimi geni bersaglio di questo fattore di trascrizione, accrescendo ulteriormente le alterazioni cellulari.

La validazione di questi nuovi geni come bersagli del miR-221 aggiunge ulteriori tasselli al quadro che descrive il contributo del miR-221 nella tumorigenesi umana. La descrizione dell'articolato ruolo di questi bersagli genici nelle vie di segnale cellulari, ben illustra il concetto secondo cui la sovra-espressione di un unico microRNA è in grado di attivare simultaneamente molte vie di segnale e processi cellulari, favorendo l'insorgenza e la promozione tumorale. Se da un lato perciò l'espressione aberrante di un unico microRNA apporta un notevole contributo alla trasformazione tumorale, dall'altro risulta chiaro che il blocco della sua espressione può avere importanti effetti anti-tumoral. Proprio per questo motivo la ricerca dei farmaci oncologici si sta muovendo sempre maggiormente verso la messa a punto di strategie terapeutiche che hanno come bersaglio i microRNA.

Il ruolo oncogenico del miR-221, in particolare in epatocarcinoma, è suggerito da risultati *in vitro* ottenuti in questo ed in studi precedenti. Tuttavia questa ipotesi non è mai stata provata adeguatamente *in vivo*. Pineau e colleghi hanno dimostrato che cellule progenitrici epatiche, infettate con un retrovirus sovra-esprimente miR-221 e successivamente iniettate in topi nudi, causavano comparsa tumorale precoce e più rapida progressione neoplastica rispetto ai controlli(60), tuttavia il modello utilizzato in questo lavoro è piuttosto lontano da quello fisiologico. Al fine di valutare gli effetti dell'aberrante espressione epatica del microRNA, abbiamo sviluppato il primo modello di topo transgenico in grado di sovra-esprimere miR-221 nel fegato. Un approccio simile è stato adottato in precedenza da Santanam e colleghi, i quali hanno creato un topo transgenico che sovra-esprimeva miR-29 nei linfociti B e grazie a questo modello animale hanno potuto provare che la dis-regolazione di miR-29 contribuiva all'insorgenza della leucemia linfatica cronica (119). L'efficacia del modello creato è stata provata dal fatto che il miR-221 risultava effettivamente sovra-espresso negli epatociti dei topi, mentre l'espressione di alcuni suoi geni bersaglio già validati (Cdkn1B/p27, Cdkn1C/p57, Bmf) diminuiva in modo significativo. L'incremento della massa epatica dei topi transgenici,

rispetto ai controlli, confermava il fatto che il microRNA favorisse i processi proliferativi cellulari anche *in vivo*, analogamente a quanto dimostrato *in vitro*(61). L'analisi di espressione genica effettuata su campioni di fegato derivanti da topi transgenici a confronto con campioni epatici di topi *wild type*, ha dimostrato che i due gruppi di campioni differivano significativamente nell'espressione di un gruppo di quasi 500 geni. Questo dato esemplifica i drammatici effetti della sovra-espressione di un unico microRNA sull'espressione genica della cellula. Sarà interessante approfondire lo studio di questi geni, per identificare nuovi potenziali bersagli genici del miR-221 e individuare un eventuale profilo genico predisponente all'insorgenza di epatocarcinoma.

I topi transgenici creati mostravano forte predisposizione per lo sviluppo di tumori epatici, rispetto ai topi di controllo. In particolare i primi noduli neoplastici comparivano negli animali maschi a 9 mesi di età, mentre nei controlli non comparivano tumori. Il trattamento con il carcinogeno di-etil-nitrosamina (DENa) è servito per accelerare l'effetto oncogenico e in effetti ha permesso di riscontrare le prime masse tumorali nei topi transgenici già a 3 mesi di età, mentre i controlli *wild type* trattati con DENa sviluppavano tumori non prima di 6 mesi. Oltre alla precoce insorgenza, i tumori dei topi transgenici erano più numerosi e di maggiori dimensioni rispetto a quelli riscontrati nei topi *wild type*, trattati con il carcinogeno. Il fatto che i topi maschi fossero maggiormente predisposti alla comparsa di tumori epatici, conferma l'evidenza ormai consolidata secondo cui gli estrogeni svolgano un ruolo protettivo verso l'epatocarcinogenesi(120). In base ai dati ottenuti, risulta chiaro che l'espressione aberrante di miR-221 costituisce un evento promuovente la trasformazione tumorale; questa affermazione è confermata anche dall'osservazione che l'espressione del miR-221 aumentava ulteriormente nei tumori sviluppati rispetto ai livelli misurati nei fegati sani dei topi transgenici. Nelle neoplasie epatiche comparse nei topi transgenici, oltre all'incremento dei livelli di miR-221, è stata riscontrata anche variazione nell'espressione di altri microRNA frequentemente alterati nell'epatocarcinoma umano: analogamente a quanto avviene nei tumori epatici umani, l'espressione di miR-21 era maggiore negli epatocarcinomi, rispetto al fegato sano dei topi, mentre i microRNA-122 e -199 sono risultati sotto-espressi nelle cellule tumorali. Il fatto che l'espressione di questi microRNA variasse in modo simile negli epatocarcinomi murini e in quelli umani, rispetto ai relativi campioni di fegato sano, indica la somiglianza molecolare dei tumori insorti nei topi transgenici con gli epatocarcinomi umani. Perciò i topi creati costituiscono un buon modello per lo studio dell'epatocarcinoma umano e

possono essere usati come modelli pre-clinici per testare molecole terapeutiche anti-tumorali.

La messa a punto di strategie terapeutiche che abbiano i microRNA come bersaglio sta interessando sempre più il mondo scientifico. Il grosso potenziale terapeutico di molecole in grado di inibire l'azione di un microRNA sovra-espresso nei tumori, è dato dal fatto che indirettamente agiscono su tutti i suoi geni bersaglio e possono quindi colpire le cellule tumorali bloccando più vie di segnale oncogeniche contemporaneamente. Perciò l'utilizzo dei microRNA come bersagli terapeutici è di grande interesse, soprattutto per quanto riguarda le patologie complesse, come i tumori, caratterizzati da molte anomalie geniche. La fattibilità di queste strategie è confermata da studi precedenti effettuati sia nei topi, che nei primati: la somministrazione di un oligonucleotide anti-miR-122 in topi ha permesso di ridurre i livelli epatici del microRNA, provocando un incremento dell'espressione dei suoi bersagli genici e una conseguente diminuzione del colesterolo(121). Stesso risultato clinico è stato ottenuto in scimmie, in seguito alla somministrazione di LNA anti-miR-122(122). Tuttavia il problema di questi approcci è legato alla biodisponibilità terapeutica della molecola, che, una volta somministrata, deve essere in grado di raggiungere il suo organo bersaglio, in quantità sufficiente per ottenere gli effetti terapeutici, riducendo al minimo gli effetti collaterali. Il fegato si presta bene a tale scopo, grazie alla sua propensione fisiologica ad acquisire le molecole presenti nel sangue. Perciò il fegato è sicuramente l'organo di elezione per la messa a punto di strategie terapeutiche innovative basate sui microRNA e il miR-221, essendo uno dei microRNA più sovra-espressi in epatocarcinoma, rappresenta uno dei candidati ideali a questi studi.

A questo proposito il topo transgenico creato è stato utilizzato per testare l'efficacia di una molecola anti-miR-221. Come detto precedentemente esistono diversi tipi di molecole in grado di contrastare l'azione dei microRNA, tuttavia gli anti-miR sono quelli più frequentemente utilizzati. Park e colleghi, dopo aver testato diversi tipi di oligonucleotidi anti-miR-221, caratterizzati da diverse modifiche chimiche, hanno dimostrato che la molecola più efficace nel ridurre gli effetti del miR-221 era quella contenente tutti nucleotidi metilati e legami fosforotioati alle due estremità(71) e la molecola usata in questo lavoro ha struttura analoga.

La somministrazione dell'anti-miR, mediante iniezione attraverso la vena caudale dei topi, ha determinato una diminuzione dei livelli plasmatici e epatici di miR-221 e aumento dei livelli epatici di proteina p27, ad indicare che la metodica di somministrazione adottata era efficace nel veicolare la molecola nel fegato ed era in grado di ridurre i livelli di miR-221 circolanti. È stato interessante notare che nei topi transgenici in cui era stato iniettato l'anti-miR-221 si aveva una minore insorgenza di epatocarcinoma e le lesioni neoplastiche erano di dimensioni inferiori rispetto a quelle misurate nei topi transgenici non trattati. Inoltre il numero di tumori e la dimensione media delle masse neoplastiche degli animali transgenici trattati con anti-miR-221 erano paragonabili a quelli riscontrati nei topi wild type e questo indica che l'oligonucleotide anti-miR era efficace nel revertire gli effetti legati alla sovra-espressione del miR-221.

Questo studio in vivo ha permesso di dimostrare il diretto coinvolgimento della sovra-espressione del miR-221 nel favorire la tumorigenesi epatica e ha inoltre dimostrato che l'utilizzo di oligonucleotidi anti-miR-221 è efficace nel bloccare l'azione del miR-221 e nell'inibire la crescita tumorale. Altri studi sono stati fatti in merito: Park e colleghi hanno recentemente pubblicato uno studio in cui hanno dimostrato che era possibile veicolare anti-miR-221 in xenotrapianti di cellule derivate da epatocarcinoma umano, in topi, e che questo oligonucleotide era in grado di diminuire la proliferazione cellulare e di aumentare la sopravvivenza degli animali(71). Analogamente Mercatelli ha dimostrato che la somministrazione di antagomiR-anti-miR-221 in cellule di tumore prostatico PC3, trapiantate in topi provocava abbassamento dei livelli endogeni di miR-221, ripristino dell'espressione di p27 e riduzione della proliferazione cellulare (59). Tutti gli studi precedenti hanno utilizzato xenotrapianti per testare l'efficacia delle molecole anti-miR; questo è il primo studio in cui gli anti-miR vengono somministrati per il trattamento di tumori endogeni, comparsi nell'animale e rappresenta perciò una condizione più simile a quella fisiologica.

Questi studi iniziali sull'efficacia degli oligonucleotidi anti-miR-221 come anti-tumorali sono interessanti nell'ipotesi di sviluppare in futuro molecole terapeutiche per curare l'epatocarcinoma, basate sull'inibizione dell'attività del miR-221. L'utilizzo di queste strategie terapeutiche innovative nella pratica clinica è possibile. Ad esempio, l'azienda farmaceutica Santaris Pharma sta sviluppando un farmaco, Miravirsen, il cui principio attivo è un LNA anti-miR-122. Questo farmaco ha appena superato la fase 2 di un trial

clinico, mostrando promettenti risultati nel trattamento dell'infezione da virus dell'epatite C (Santaris Pharma, ClinicalTrials.gov).

CONCLUSIONI

Lo studio effettuato in questo lavoro è stato finalizzato a valutare il ruolo nella tumorigenesi, in particolare nell'epatocarcinoma, del miR-221, un microRNA frequentemente sovra-espresso in molti tipi di tumori umani. Le vie di segnale risultate alterate in seguito alla sovra-espressione del microRNA in linee derivate da epatocarcinoma, e i nuovi bersagli genici individuati, dimostrano l'importante ruolo del miR-221 nell'indurre vie pro-proliferative e anti-apoptotiche, processi che sono spesso coinvolti nella fasi iniziali della trasformazione tumorale. Inoltre lo sviluppo di un modello di topo transgenico che sovra-esprime miR-221 nel fegato ha permesso di dimostrare l'effettiva potenzialità oncogena del microRNA *in vivo* e di testare l'efficacia di un oligonucleotide anti-miR-221, nel contrastare gli effetti del microRNA e rallentare la proliferazione tumorale, delineando la fattibilità di un approccio terapeutico nel trattamento dell'epatocarcinoma, basato sull'utilizzo di molecole in grado di contrastare l'azione del miR-221.

BIBLIOGRAFIA

1. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001;294:853-858.
2. Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA. *Trends Genet* 2006;22:165-173.
3. Farazi TA, Spitzer JI, Morozov P, Tuschl T. miRNAs in human cancer. *J Pathol* 2011;223:102-115.
4. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003;115:787-798.
5. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 2007;318:1931-1934.
6. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 2005;3:e85.
7. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:15524-15529.
8. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:13944-13949.
9. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435:834-838.
10. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:2999-3004.
11. Lehmann U, Hasemeier B, Christgen M, Muller M, Romermann D, Langer F, Kreipe H. Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer. *J Pathol* 2008;214:17-24.
12. Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet* 2007;39:673-677.
13. Lambert I, Nittner D, Mestdagh P, Denecker G, Vandesompele J, Dyer MA, Marine JC. Monoallelic but not biallelic loss of Dicer1 promotes tumorigenesis in vivo. *Cell Death Differ* 2010;17:633-641.
14. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005;65:7065-7070.
15. Michael MZ, Smith OC, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 2003;1:882-891.
16. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 2006;9:189-198.
17. Iorio MV, Visone R, Di Leva G, Donati V, Petrocca F, Casalini P, Taccioli C, et al. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res* 2007;67:8699-8707.
18. Ozen M, Creighton CJ, Ozdemir M, Ittmann M. Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. *Oncogene* 2008;27:1788-1793.
19. Varnholt H, Drebber U, Schulze F, Wedemeyer I, Schirmacher P, Dienes HP, Odenthal M. MicroRNA gene expression profile of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008;47:1223-1232.
20. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 2007;133:647-658.
21. Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem* 2007;282:14328-14336.

22. Miller TE, Ghoshal K, Ramaswamy B, Roy S, Datta J, Shapiro CL, Jacob S, et al. MicroRNA-221/222 confers tamoxifen resistance in breast cancer by targeting p27Kip1. *J Biol Chem* 2008;283:29897-29903.
23. Ferracin M, Pedriali M, Veronese A, Zagatti B, Gafa R, Magri E, Lunardi M, et al. MicroRNA profiling for the identification of cancers with unknown primary tissue-of-origin. *J Pathol* 2011;225:43-53.
24. Schrauder MG, Strick R, Schulz-Wendtland R, Strissel PL, Kahmann L, Loehberg CR, Lux MP, et al. Circulating Micro-RNAs as Potential Blood-Based Markers for Early Stage Breast Cancer Detection. *PLoS One* 2012;7:e29770.
25. Spizzo R, Nicoloso MS, Lupini L, Lu Y, Fogarty J, Rossi S, Zagatti B, et al. miR-145 participates with TP53 in a death-promoting regulatory loop and targets estrogen receptor-alpha in human breast cancer cells. *Cell Death Differ* 2010;17:246-254.
26. Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, Wentzel EA, Montgomery CL, Hwang HW, Chang TC, et al. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell* 2009;137:1005-1017.
27. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 2005;65:6029-6033.
28. Li YJ, Zhang YX, Wang PY, Chi YL, Zhang C, Ma Y, Lv CJ, et al. Regression of A549 lung cancer tumors by anti-miR-150 vector. *Oncol Rep* 2012;27:129-134.
29. Schutte K, Bornschein J, Malfertheiner P. Hepatocellular carcinoma--epidemiological trends and risk factors. *Dig Dis* 2009;27:80-92.
30. Gramantieri L, Fornari F, Callegari E, Sabbioni S, Lanza G, Croce CM, Bolondi L, et al. MicroRNA involvement in hepatocellular carcinoma. *J Cell Mol Med* 2008;12:2189-2204.
31. Boige V, Laurent-Puig P, Fouchet P, Flejou JF, Monges G, Bedossa P, Bioulac-Sage P, et al. Concerted nonsyntenic allelic losses in hyperploid hepatocellular carcinoma as determined by a high-resolution allelotype. *Cancer Res* 1997;57:1986-1990.
32. Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature* 1991;350:429-431.
33. Joo M, Kang YK, Kim MR, Lee HK, Jang JJ. Cyclin D1 overexpression in hepatocellular carcinoma. *Liver* 2001;21:89-95.
34. Ito Y, Sasaki Y, Horimoto M, Wada S, Tanaka Y, Kasahara A, Ueki T, et al. Activation of mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1998;27:951-958.
35. Xu XR, Huang J, Xu ZG, Qian BZ, Zhu ZD, Yan Q, Cai T, et al. Insight into hepatocellular carcinogenesis at transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:15089-15094.
36. Fischer AN, Fuchs E, Mikula M, Huber H, Beug H, Mikulits W. PDGF essentially links TGF-beta signaling to nuclear beta-catenin accumulation in hepatocellular carcinoma progression. *Oncogene* 2007;26:3395-3405.
37. Hirohashi K, Yamamoto T, Uenishi T, Ogawa M, Sakabe K, Takemura S, Shuto T, et al. CD44 and VEGF expression in extrahepatic metastasis of human hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2004;51:1121-1123.
38. Varela I, Tarpey P, Raine K, Huang D, Ong CK, Stephens P, Davies H, et al. Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. *Nature* 2011;469:539-542.
39. Hou J, Lin L, Zhou W, Wang Z, Ding G, Dong Q, Qin L, et al. Identification of miRNomes in human liver and hepatocellular carcinoma reveals miR-199a/b-3p as therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 2011;19:232-243.
40. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 2005;309:1577-1581.

41. Gramantieri L, Ferracin M, Fornari F, Veronese A, Sabbioni S, Liu CG, Calin GA, et al. Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2007;67:6092-6099.
42. Lin CJ, Gong HY, Tseng HC, Wang WL, Wu JL. miR-122 targets an anti-apoptotic gene, Bcl-w, in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;375:315-320.
43. Qi P, Cheng SQ, Wang H, Li N, Chen YF, Gao CF. Serum MicroRNAs as Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma in Chinese Patients with Chronic Hepatitis B Virus Infection. *PLoS One* 2011;6:e28486.
44. Fornari F, Milazzo M, Chieco P, Negrini M, Calin GA, Grazi GL, Pollutri D, et al. MiR-199a-3p regulates mTOR and c-Met to influence the doxorubicin sensitivity of human hepatocarcinoma cells. *Cancer Res* 2010;70:5184-5193.
45. Lin EA, Kong L, Bai XH, Luan Y, Liu CJ. miR-199a, a bone morphogenic protein 2-responsive MicroRNA, regulates chondrogenesis via direct targeting to Smad1. *J Biol Chem* 2009;284:11326-11335.
46. Jia XQ, Cheng HQ, Qian X, Bian CX, Shi ZM, Zhang JP, Jiang BH, et al. Lentivirus-Mediated Overexpression of MicroRNA-199a Inhibits Cell Proliferation of Human Hepatocellular Carcinoma. *Cell Biochem Biophys* 2012;62:237-244.
47. Karakatsanis A, Papaconstantinou I, Gazouli M, Lyberopoulou A, Polymeneas G, Voros D. Expression of microRNAs, miR-21, miR-31, miR-122, miR-145, miR-146a, miR-200c, miR-221, miR-222, and miR-223 in patients with hepatocellular carcinoma or intrahepatic cholangiocarcinoma and its prognostic significance. *Mol Carcinog* 2011.
48. Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S, Allgayer H. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* 2008;27:2128-2136.
49. Yan XJ, Xu J, Gu ZH, Pan CM, Lu G, Shen Y, Shi JY, et al. Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. *Nat Genet* 2011;43:309-315.
50. Zhou J, Yu L, Gao X, Hu J, Wang J, Dai Z, Wang JF, et al. Plasma MicroRNA Panel to Diagnose Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma. *J Clin Oncol* 2011;29:4781-4788.
51. Ladeiro Y, Couchy G, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Pelletier L, Rebouissou S, Zucman-Rossi J. MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations. *Hepatology* 2008;47:1955-1963.
52. Jiang J, Gusev Y, Aderca I, Mettler TA, Nagorney DM, Brackett DJ, Roberts LR, et al. Association of MicroRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival. *Clin Cancer Res* 2008;14:419-427.
53. Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H, Mori N, Tamesa T, Okada T, Takemoto N, et al. Comparison of gene expression profiles between hepatitis B virus- and hepatitis C virus-infected hepatocellular carcinoma by oligonucleotide microarray data on the basis of a supervised learning method. *Cancer Res* 2002;62:3939-3944.
54. Ye QH, Qin LX, Forgues M, He P, Kim JW, Peng AC, Simon R, et al. Predicting hepatitis B virus-positive metastatic hepatocellular carcinomas using gene expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 2003;9:416-423.
55. Quintavalle C, Garofalo M, Zanca C, Romano G, Iaboni M, Del Basso De Caro M, Martinez-Montero JC, et al. miR-221/222 overexpression in human glioblastoma increases invasiveness by targeting the protein phosphate PTPmu. *Oncogene* 2011.
56. Gottardo F, Liu CG, Ferracin M, Calin GA, Fassan M, Bassi P, Sevignani C, et al. Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers. *Urol Oncol* 2007;25:387-392.

57. Visone R, Russo L, Pallante P, De Martino I, Ferraro A, Leone V, Borbone E, et al. MicroRNAs (miR)-221 and miR-222, both overexpressed in human thyroid papillary carcinomas, regulate p27Kip1 protein levels and cell cycle. *Endocr Relat Cancer* 2007;14:791-798.
58. Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, Nuovo GJ, Lerner MR, Frankel WL, Morgan DL, et al. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2007;120:1046-1054.
59. Mercatelli N, Coppola V, Bonci D, Miele F, Costantini A, Guadagnoli M, Bonanno E, et al. The inhibition of the highly expressed miR-221 and miR-222 impairs the growth of prostate carcinoma xenografts in mice. *PLoS One* 2008;3:e4029.
60. Pineau P, Volinia S, McJunkin K, Marchio A, Battiston C, Terris B, Mazzaferro V, et al. miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:264-269.
61. Fornari F, Gramantieri L, Ferracin M, Veronese A, Sabbioni S, Calin GA, Grazi GL, et al. MiR-221 controls CDKN1C/p57 and CDKN1B/p27 expression in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2008;27:5651-5661.
62. Gramantieri L, Fornari F, Ferracin M, Veronese A, Sabbioni S, Calin GA, Grazi GL, et al. MicroRNA-221 targets Bmf in hepatocellular carcinoma and correlates with tumor multifocality. *Clin Cancer Res* 2009;15:5073-5081.
63. Zhang C, Zhang J, Zhang A, Wang Y, Han L, You Y, Pu P, et al. PUMA is a novel target of miR-221/222 in human epithelial cancers. *Int J Oncol* 2010;37:1621-1626.
64. Zhang CZ, Zhang JX, Zhang AL, Shi ZD, Han L, Jia ZF, Yang WD, et al. MiR-221 and miR-222 target PUMA to induce cell survival in glioblastoma. *Mol Cancer* 2010;9:229.
65. Garofalo M, Di Leva G, Romano G, Nuovo G, Suh SS, Ngankeu A, Taccioli C, et al. miR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 downregulation. *Cancer Cell* 2009;16:498-509.
66. Shah MY, Calin GA. MicroRNAs miR-221 and miR-222: a new level of regulation in aggressive breast cancer. *Genome Med* 2011;3:56.
67. Li J, Wang Y, Yu W, Chen J, Luo J. Expression of serum miR-221 in human hepatocellular carcinoma and its prognostic significance. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;406:70-73.
68. Lin Q, Mao W, Shu Y, Lin F, Liu S, Shen H, Gao W, et al. A cluster of specified microRNAs in peripheral blood as biomarkers for metastatic non-small-cell lung cancer by stem-loop RT-PCR. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012;138:85-93.
69. Kanemaru H, Fukushima S, Yamashita J, Honda N, Oyama R, Kakimoto A, Masuguchi S, et al. The circulating microRNA-221 level in patients with malignant melanoma as a new tumor marker. *J Dermatol Sci* 2011;61:187-193.
70. Pu XX, Huang GL, Guo HQ, Guo CC, Li H, Ye S, Ling S, et al. Circulating miR-221 directly amplified from plasma is a potential diagnostic and prognostic marker of colorectal cancer and is correlated with p53 expression. *J Gastroenterol Hepatol* 2010;25:1674-1680.
71. Park JK, Kogure T, Nuovo GJ, Jiang J, He L, Kim JH, Phelps MA, et al. miR-221 silencing blocks hepatocellular carcinoma and promotes survival. *Cancer Res* 2011;71:7608-7616.
72. Ferracin M, Gafa R, Miotto E, Veronese A, Pultrone C, Sabbioni S, Lanza G, et al. The methylator phenotype in microsatellite stable colorectal cancers is characterized by a distinct gene expression profile. *J Pathol* 2008;214:594-602.
73. da Costa LT, He TC, Yu J, Sparks AB, Morin PJ, Polyak K, Laken S, et al. CDX2 is mutated in a colorectal cancer with normal APC/beta-catenin signaling. *Oncogene* 1999;18:5010-5014.
74. Koen H, Pugh TD, Goldfarb S. Centrilobular distribution of diethylnitrosamine-induced hepatocellular foci in the mouse. *Lab Invest* 1983;49:78-81.
75. Robertson KD, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, Wade PA, Jones PL, Wolffe AP. DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet* 2000;25:338-342.
76. Kramer MG, Barajas M, Razquin N, Berraondo P, Rodrigo M, Wu C, Qian C, et al. In vitro and in vivo comparative study of chimeric liver-specific promoters. *Mol Ther* 2003;7:375-385.

77. Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 2005;438:685-689.
78. van Dongen S, Abreu-Goodger C, Enright AJ. Detecting microRNA binding and siRNA off-target effects from expression data. *Nat Methods* 2008;5:1023-1025.
79. McCall MN, Kent OA, Yu J, Fox-Talbot K, Zaiman AL, Halushka MK. MicroRNA profiling of diverse endothelial cell types. *BMC Med Genomics* 2011;4:78.
80. Galardi S, Mercatelli N, Giorda E, Massalini S, Frajese GV, Ciafre SA, Farace MG. miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1. *J Biol Chem* 2007;282:23716-23724.
81. le Sage C, Nagel R, Egan DA, Schrier M, Mesman E, Mangiola A, Anile C, et al. Regulation of the p27(Kip1) tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation. *EMBO J* 2007;26:3699-3708.
82. Thompson MD, Monga SP. WNT/beta-catenin signaling in liver health and disease. *Hepatology* 2007;45:1298-1305.
83. Rao X, Di Leva G, Li M, Fang F, Devlin C, Hartman-Frey C, Burow ME, et al. MicroRNA-221/222 confers breast cancer fulvestrant resistance by regulating multiple signaling pathways. *Oncogene* 2011;30:1082-1097.
84. Milet C, Rincheval-Arnold A, Mignotte B, Guenal I. The Drosophila retinoblastoma protein induces apoptosis in proliferating but not in post-mitotic cells. *Cell Cycle* 2010;9:97-103.
85. Hansen MF, Koufos A, Gallie BL, Phillips RA, Fodstad O, Brogger A, Gedde-Dahl T, et al. Osteosarcoma and retinoblastoma: a shared chromosomal mechanism revealing recessive predisposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:6216-6220.
86. Kitamura H, Yazawa T, Sato H, Okudela K, Shimoyamada H. Small cell lung cancer: significance of RB alterations and TTF-1 expression in its carcinogenesis, phenotype, and biology. *Endocr Pathol* 2009;20:101-107.
87. Macleod KF. The RB tumor suppressor: a gatekeeper to hormone independence in prostate cancer? *J Clin Invest* 2010;120:4179-4182.
88. Cito L, Pentimalli F, Forte I, Mattioli E, Giordano A. Rb family proteins in gastric cancer (review). *Oncol Rep* 2010;24:1411-1418.
89. Jiang Z, Jones R, Liu JC, Deng T, Robinson T, Chung PE, Wang S, et al. RB1 and p53 at the crossroad of EMT and triple-negative breast cancer. *Cell Cycle* 2011;10:1563-1570.
90. Viatour P, Ehmer U, Saddic LA, Dorrell C, Andersen JB, Lin C, Zmoos AF, et al. Notch signaling inhibits hepatocellular carcinoma following inactivation of the RB pathway. *J Exp Med* 2011;208:1963-1976.
91. Hu N, Gutschmann A, Herbert DC, Bradley A, Lee WH, Lee EY. Heterozygous Rb-1 delta 20/+mice are predisposed to tumors of the pituitary gland with a nearly complete penetrance. *Oncogene* 1994;9:1021-1027.
92. Burkhart DL, Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer* 2008;8:671-682.
93. Anichini A, Mortarini R, Sensi M, Zanon M. APAF-1 signaling in human melanoma. *Cancer Lett* 2006;238:168-179.
94. Paik SS, Jang KS, Song YS, Jang SH, Min KW, Han HX, Na W, et al. Reduced expression of Apaf-1 in colorectal adenocarcinoma correlates with tumor progression and aggressive phenotype. *Ann Surg Oncol* 2007;14:3453-3459.
95. Falini B, Tiacci E, Liso A, Basso K, Sabattini E, Pacini R, Foa R, et al. Simple diagnostic assay for hairy cell leukaemia by immunocytochemical detection of annexin A1 (ANXA1). *Lancet* 2004;363:1869-1870.
96. Zhang Z, Huang L, Zhao W, Rigas B. Annexin 1 induced by anti-inflammatory drugs binds to NF-kappaB and inhibits its activation: anticancer effects in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2010;70:2379-2388.

97. Wang LP, Bi J, Yao C, Xu XD, Li XX, Wang SM, Li ZL, et al. Annexin A1 expression and its prognostic significance in human breast cancer. *Neoplasma* 2010;57:253-259.
98. Bist P, Leow SC, Phua QH, Shu S, Zhuang Q, Loh WT, Nguyen TH, et al. Annexin-1 interacts with NEMO and RIP1 to constitutively activate IKK complex and NF-kappaB: implication in breast cancer metastasis. *Oncogene* 2011;30:3174-3185.
99. Maschler S, Gebeshuber CA, Wiedemann EM, Alacakaptan M, Schreiber M, Cusic I, Beug H. Annexin A1 attenuates EMT and metastatic potential in breast cancer. *EMBO Mol Med* 2010;2:401-414.
100. Wang D, Zhang H, Fang Z, Yu G. Annexin-1 downregulation is associated with clinical outcome in Chinese patients with hilar cholangiocarcinoma. *Eur Surg Res* 2010;45:151-157.
101. Long Q, Johnson BA, Osunkoya AO, Lai YH, Zhou W, Abramovitz M, Xia M, et al. Protein-coding and microRNA biomarkers of recurrence of prostate cancer following radical prostatectomy. *Am J Pathol* 2011;179:46-54.
102. D'Acunतो CW, Fontanella B, Rodriguez M, Taddei M, Parente L, Petrella A. Histone deacetylase inhibitor FR235222 sensitizes human prostate adenocarcinoma cells to apoptosis through up-regulation of Annexin A1. *Cancer Lett* 2010;295:85-91.
103. Sorensen CS, Syljuasen RG. Safeguarding genome integrity: the checkpoint kinases ATR, CHK1 and WEE1 restrain CDK activity during normal DNA replication. *Nucleic Acids Res* 2012;40:477-486.
104. Kiviharju-af Hallstrom TM, Jaamaa S, Monkkonen M, Peltonen K, Andersson LC, Medema RH, Peehl DM, et al. Human prostate epithelium lacks Wee1A-mediated DNA damage-induced checkpoint enforcement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:7211-7216.
105. Tili E, Michaille JJ, Wernicke D, Alder H, Costinean S, Volinia S, Croce CM. Mutator activity induced by microRNA-155 (miR-155) links inflammation and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:4908-4913.
106. Butz H, Liko I, Czirjak S, Igaz P, Khan MM, Zivkovic V, Balint K, et al. Down-regulation of Wee1 kinase by a specific subset of microRNA in human sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:E181-191.
107. Yoshida T, Tanaka S, Mogi A, Shitara Y, Kuwano H. The clinical significance of Cyclin B1 and Wee1 expression in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2004;15:252-256.
108. Mir SE, De Witt Hamer PC, Krawczyk PM, Balaj L, Claes A, Niers JM, Van Tilborg AA, et al. In silico analysis of kinase expression identifies WEE1 as a gatekeeper against mitotic catastrophe in glioblastoma. *Cancer Cell* 2010;18:244-257.
109. Iorns E, Lord CJ, Grigoriadis A, McDonald S, Fenwick K, Mackay A, Mein CA, et al. Integrated functional, gene expression and genomic analysis for the identification of cancer targets. *PLoS One* 2009;4:e5120.
110. Fiorentino FP, Giordano A. The tumor suppressor role of CTCF. *J Cell Physiol* 2012;227:479-492.
111. Hoffman B, Amanullah A, Shafarenko M, Liebermann DA. The proto-oncogene c-myc in hematopoietic development and leukemogenesis. *Oncogene* 2002;21:3414-3421.
112. Zhang H, Niu B, Hu JF, Ge S, Wang H, Li T, Ling J, et al. Interruption of intrachromosomal looping by CCCTC binding factor decoy proteins abrogates genomic imprinting of human insulin-like growth factor II. *J Cell Biol* 2011;193:475-487.
113. Renaud S, Loukinov D, Bosman FT, Lobanenkov V, Benhattar J. CTCF binds the proximal exonic region of hTERT and inhibits its transcription. *Nucleic Acids Res* 2005;33:6850-6860.
114. De La Rosa-Velazquez IA, Rincon-Arano H, Benitez-Bribiesca L, Recillas-Targa F. Epigenetic regulation of the human retinoblastoma tumor suppressor gene promoter by CTCF. *Cancer Res* 2007;67:2577-2585.
115. Soto-Reyes E, Recillas-Targa F. Epigenetic regulation of the human p53 gene promoter by the CTCF transcription factor in transformed cell lines. *Oncogene* 2010;29:2217-2227.

116. Rodriguez C, Borgel J, Court F, Cathala G, Forne T, Piette J. CTCF is a DNA methylation-sensitive positive regulator of the INK/ARF locus. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;392:129-134.
117. Rasko JE, Klenova EM, Leon J, Filippova GN, Loukinov DI, Vatolin S, Robinson AF, et al. Cell growth inhibition by the multifunctional multivalent zinc-finger factor CTCF. *Cancer Res* 2001;61:6002-6007.
118. Soto-Reyes E, Gonzalez-Barrios R, Prada D, Cisneros-Soberanis F, Herrera-Goepfert R, Perez V, Cantu de Leon D, et al. Disruption of CTCF at the miR-125b1 locus in gynecological cancers. *BMC Cancer* 2012;12:40.
119. Santanam U, Zanesi N, Efanov A, Costinean S, Palamarchuk A, Hagan JP, Volinia S, et al. Chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted miR-29 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:12210-12215.
120. Shimizu I, Yasuda M, Mizobuchi Y, Ma YR, Liu F, Shiba M, Horie T, et al. Suppressive effect of oestradiol on chemical hepatocarcinogenesis in rats. *Gut* 1998;42:112-119.
121. Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, Watts L, et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab* 2006;3:87-98.
122. Elmen J, Lindow M, Schutz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, Lindholm M, et al. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* 2008;452:896-899.