



Università degli Studi di Firenze

Dipartimento di Fisiopatologia Clinica

Unità di Biochimica Clinica

Scuola di Dottorato in Scienze Endocrinologiche e Metaboliche, MED13

XXIII Ciclo

**RUOLO DI FATTORI GENETICI E EPIGENETICI
NELLA REGOLAZIONE DEI MICRORNA NEL
TUMORE DEL POLMONE E DEL COLON-RETTO**

Coordinatore

Chiar.mo Prof. Gianni Forti

Candidata

Dr. Serena Vinci

Tutor

Chiar.mo Prof. Claudio Orlando

1. INTRODUZIONE.....	5
1.1 MicroRNA: Localizzazione e Biogenesi.....	7
1.2 La Funzione dei MicroRNA.....	10
1.3 Nomenclatura dei MicroRNA.....	12
1.4 MicroRNA e Cancro	13
1.5 MicroRNA come Oncogeni e Oncosoppressori.....	17
1.6 MicroRNA e Polimorfismi.....	20
1.7 Controllo Epigenetico dei Geni MicroRNA.....	23
1.8 Controllo dell'Espressione dei MicroRNA attraverso Farmaci Epigenetici	25
1.9 MiRNA come Biomarcatori Tumorali	27
1.10 MicroRNA come potenziale Target Terapeutico	28
1.11 MiR-146 e il suo ruolo clinico	31
1.12 MiR-149 e il suo ruolo clinico	36
1.13 MiR-196 e il suo ruolo clinico	38
1.14 MiR-499 e il suo ruolo clinico	42
1.15 MiR-146a, miR-149, miR-196a2 e miR499.....	44
MICRORNA NEL NSCLC	46
2. IL TUMORE DEL POLMONE.....	47
2.1 Epidemiologia del Tumore del Polmone.....	47
2.2 Eziologia del NSCLC.....	48
2.3 Tipologie del Tumore del Polmone.....	49
2.4 Diagnosi e Stadiazione del Tumore al Polmone	52
2.5 Alterazioni dei MicroRNA nel Tumore del Polmone	53
2.6 Prognosi del Tumore del Polmone e MicroRNA	55
2.7 Polimorfismi e MicroRNA nel NSCLC.....	57
3. OBIETTIVO DELLO STUDIO.....	58
4. MATERIALI E METODI.....	60
4.1 Campioni di Tessuto	60
4.2 Campioni di Sangue	62
4.3 Genotipizzazione dei Campioni Mediante High Resolution Melting Analysis (HRMA)..	62
4.4 Sequenziamento	68
4.5 Real-Time RT-PCR (Reverse Transcription and Real-Time Polymerase Chain Reaction)	69
4.5.1 RT-PCR	69
4.5.2 Real-Time PCR.....	70
4.5.3 Quantificazione dei MiRNA	71
4.6 Analisi Statistica	71
4.6.1 Legge di Hardy-Weinberg	72

5 RISULTATI.....	74
5.1 Distribuzione dei Genotipi nei Tessuti NSCLC e nei Corrispettivi Tessuti Sani.....	74
5.2 Frequenza Allelica e Distribuzione dei Genotipi nei Pazienti con NSCLC e Controlli.....	75
5.3 Espressione dei MiRNA nei Tessuti NSCLC e nel Corrispettivo Tessuto Sano	76
5.4 Espressione e Genotipo dei MiRNA nei Tessuti Sani.....	77
5.5 Espressione e Genotipo dei MiRNA nei Tessuti NSCLC.....	78
5.7 Genotipi e Sopravvivenza	80
5.8 Significato Prognostico dell'Espressione dei MiRNA.....	80
6. CONCLUSIONI.....	81
MIRNA NEL CRC.....	83
7. TUMORE DEL COLON-RETTO (CRC)	84
7.1 Epidemiologia del CRC	84
7.2 Eziologia del CRC	86
7.3 Tipologie del CRC	87
7.4 Diagnosi e Stadiazione del CRC	89
7.5 Meccanismi Molecolari del CRC.....	92
7.5.1 Instabilità Genomica	93
7.5.2 Inattivazioni Mutazionali di Geni Oncosoppressori.....	95
7.5.3 Attivazione di Oncogeni	96
7.6 Alterazioni dei MicroRNA nel CRC.....	97
7.6.1 Alterazione del silenziamento genico mediato dai MiRNA nel CRC.....	97
7.6.2 Alterazione della proliferazione cellulare mediata dai MiRNA nel CRC	98
7.6.3 Alterazione dei meccanismi apoptotici mediati dai MiRNA nel CRC.....	100
7.6.4 Invasività e Metastasi mediate dai MiRNA nel CRC	101
7.6.5 MiRNA capaci di regolare il fenotipo del CRC.....	101
7.7 MiRNA come markers di suscettibilità nel CRC	102
7.8 MiRNA come markers diagnostico nel CRC.....	103
7.9 MiRNA come markers prognostico nel CRC	104
7.10 MiRNA come predittori dell'esito del trattamento nel CRC	105
8. OBIETTIVO DELLO STUDIO.....	106
9. MATERIALI E METODI.....	107
9.1 Campioni.....	107
9.2 Estrazione del DNA e Genotipizzazione.....	109
9.3 Estrazione dei MiRNA e analisi dell'Espressione	110
10. RISULTATI.....	111
10.1 Distribuzione dei genotipi nei Tessuti CRC e nelle Corrispettive Mucose Sane	111
10.2 Espressione dei MiRNA nei Tessuti CRC e nelle Corrispettive Mucose Sane.....	115
10.3 Espressione e Genotipo dei MiRNA nei Tessuti Tumorali e nelle Mucose Sane	118
11. CONCLUSIONI.....	128
ESPRESSIONE E METILAZIONE DEI MICRORNA NEL CRC.....	131
12. EPIGENETICA E MICRORNA	132

12.1 Epigenetica.....	132
12.2 Espressione dei MiRNA regolata dai Meccanismi Epigenetici	137
12.3 Epi-MiRNA.....	142
12.4 MiR-34 e il suo coinvolgimento in diverse patologie	144
12.5 MiR-9 e il suo coinvolgimento in diverse patologie	154
13. OBIETTIVO DELLO STUDIO.....	159
14. MATERIALI E METODI.....	160
14.1 Campioni di Tessuto	160
14.2 Campioni di Controllo Full Methylated e UnMethylated	160
14.3 Trattamento con Bisolfito di Sodio	161
14.4 Allestimento dei Punti Curva	163
14.5 Disegno dei Primers di Amplificazione e PCR.....	164
14.6 HRMA nello Studio della Metilazione	175
14.7 Interpretazione dei Risultati HRMA	177
14.8 Estrapolazione dei dati di Metilazione dell'Analisi HRM	181
14.9 Analisi dell'Espressione dei MiR-9-1 e -34b e -34c.....	183
15. RISULTATI.....	185
15.1 Metilazione dei miRNA nei Tessuti CRC e nella Mucosa Sana.....	185
15.3 Correlazione tra Metilazione e Espressione dei MiRNA	188
16. CONCLUSIONI.....	194
17. CONCLUSIONI DEI TRE STUDI.....	197
18. BIBLIOGRAFIA.....	199
RINGRAZIAMENTI.....	231

1. INTRODUZIONE

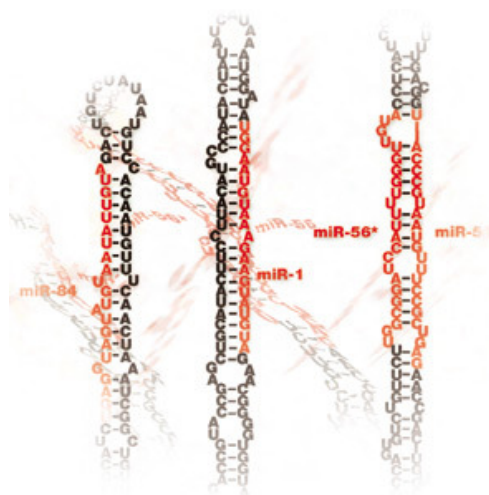


Figura1 MicroRNA

chiamato microRNA (miRNA) [1].

I miRNA sono RNA a singola elica (ssRNA) lunghi circa 19-25 nucleotidi, generati da trascritti endogeni a forma di forcina. (Fig.1) [2]; hanno un ruolo importante nell'inattivazione dell'espressione di un gene attraverso il loro appaiamento con siti del target a RNA messaggero (mRNA) attraverso una parziale complementarietà, solitamente nella regione 3' non tradotta (UTR).

Con il legame del miRNA al suo target a mRNA si esercita l'effetto regolatorio attraverso o il silenziamento del messaggero o attraverso l'inibizione traduzionale [3, 4].

Il numero dei piccoli RNA non codificanti conosciuti nei diversi microrganismi sta crescendo esponenzialmente, soprattutto grazie alle metodiche di clonaggio e di sequenziamento[3].

Nell'uomo, circa il 3% dei geni codificano per miRNA e più del 30% dei geni codificanti per proteine possono essere regolati dai miRNA [5].

Attualmente secondo ciò che è riportato dal miRbase (<http://www.mirbase.org>), per *Homo sapiens* sono stati identificati 1048 miRNA [6].

I miRNA hanno un ruolo fondamentale in diversi processi, come lo sviluppo, la differenziazione, la proliferazione cellulare, l'apoptosi e la risposta agli stress[3].

Nel corso degli ultimi anni, l'interesse verso i miRNA è incrementato in modo esponenziale, documentabile anche dal numero di pubblicazioni che ci sono pervenute su questo argomento (Fig. 2).

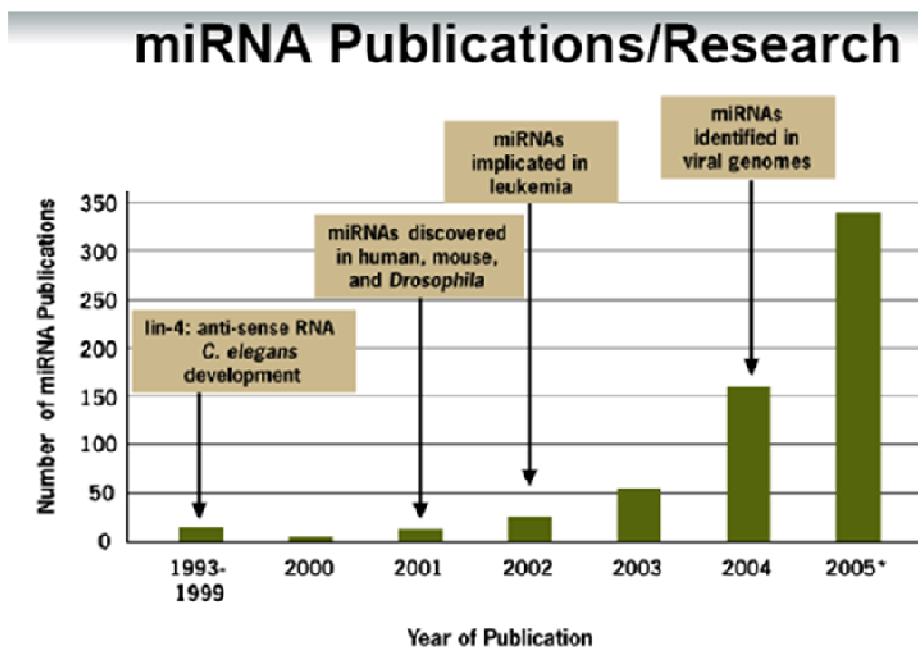


Figura 2 Incremento del numero di pubblicazioni sui miRNA nel corso degli anni

Molti miRNA sono implicati nella patogenesi della maggior parte dei tumori umani[7].

Sia la perdita, che l'acquisizione della funzione dei miRNA contribuisce allo sviluppo tumorale attraverso differenti meccanismi[3].

Recentemente è emersa la possibilità che i miRNA possano essere una nuova classe di biomarcatori, vista la loro alterata espressione nel cancro[7, 8, 9].

Poiché i miRNA regolano la differenziazione cellulare, la proliferazione, la sopravvivenza e lo sviluppo di metastasi, manipolarne la funzione, può essere una potente strategia terapeutica per interferire con l'iniziazione tumorale e con la progressione[3].

1.1 MicroRNA: Localizzazione e Biogenesi

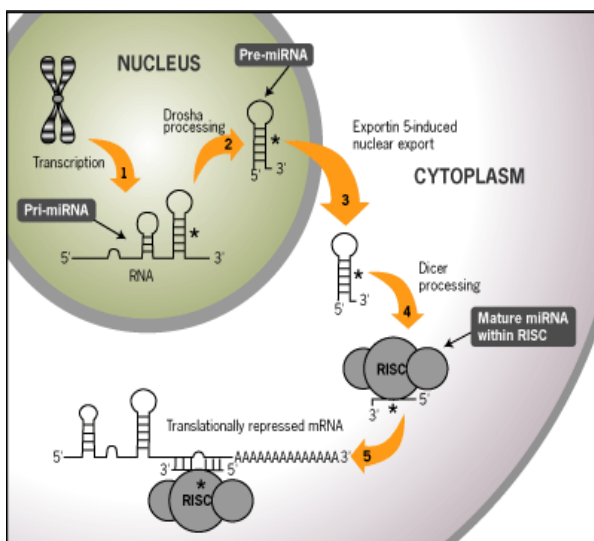


Figura 3 Biogenesi dei microRNA

L'analisi genomica ha rilevato che più del 50% dei miRNA nei mammiferi sono localizzati sia all'interno di regioni introniche di geni codificanti per proteine, ma anche in geni che non codificano per proteine; alcuni di questi miRNA sono trascritti da promotori interni [10].

Altri miRNA, localizzati nelle regioni intergeniche, hanno i loro elementi regolatori trascrizionali e costituiscono unità di trascrizione indipendenti.

La biogenesi dei miRNA nelle cellule umane è un processo complesso, che prevede multistep. I geni dei miRNA (detti miR) sono trascritti, all'interno del nucleo, da RNA polimerasi II per formare il trascritto primario del miRNA (pri-miRNA) poliadenilato, che varia da diverse centinaia a migliaia di nucleotidi di lunghezza (Fig. 3 e 5) [7, 11, 12];

sebbene un minor gruppo di miRNA può essere trascritto dal RNA polimerasi III [13].

Il pri-miRNA contiene una struttura caratterizzata da un appaiamento imperfetto, un loop terminale, e sequenze fiancheggianti [14].

Il pri-miRNA è successivamente processato dalla proteina nucleare Drosha, una grande proteina di 160 kDa che fa parte del RNase III di classe II, per produrre un secondo precursore (pre-miRNA) di 60-100 nucleotidi di lunghezza, con una caratteristica struttura a forcina (Fig. 3 e 5) [15, 16, 12].

La proteina Drosha possiede un dominio detto RNase III like domains (RIID), un dominio legante RNA a doppia elica (dsRBD) e all' N-terminale, una regione ricca di prolina e una ricca di serina/arginina di cui non si conosce la funzione [3].

E' stato proposto che Drosha possa riconoscere il pri-miRNA attraverso la struttura dello stem-loop e poi tagliare lo stelo (stem) ad una determinata distanza dal loop in modo da liberare il pre-miRNA [3].

Secondo studi eseguiti su culture cellulari, sembra che diverse proteine associate a Drosha siano in grado di discriminare specificamente la struttura a stem-loop del pri-miRNA dallo stem-loop degli RNA cellulari. Infatti Drosha fa parte di un complesso proteico di 650 kDa, chiamato Microprocessore [17], dove Drosha interagisce con i suoi cofattori DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8 protein) [18, 12].

Drosha funziona come subunità catalitica, mentre DGCR8 riconosce il substrato. Dopo l'attività nucleare del microprocessore, il pre-miRNA prodotto è esportato nel citoplasma attraverso Esportina 5 (Exp5) e il suo cofattore Ran-guanosina trifosfato (Ran-GTP) [19].

Il complesso Exp5/Ran-GTP ha un'alta affinità per il pre-miRNA, proteggendolo dal momento che è stato generato nel nucleo, fino a che non è pronto per il clivaggio nel citoplasma, dove GTP viene idrolizzato a guanosina difosfato (GDP); a questo punto il complesso Exp5/Ran-GDP rilascia il suo carico (Fig. 3 e 5) [19].

Nel citoplasma, il pre-miRNA è tagliato da Dicer, un RNase III di classe III, di 200kDa, caratterizzato da diversi domini, come il dominio RNA elicasi/ ATPase, il DUF283 e PAZ, due vicini RIIIDs (RIIIa e RIIIb) e un dsRBD (Fig. 3, 4 e 5) [20,12].

Il dsRBD e RIIID sono coinvolti nel legame e nel clivaggio della doppia elica di RNA. Le proteine con domini leganti RNA a doppia elica, come la proteina legante RNA come transattivazione della risposta (TRBP) e la proteina attivatoria della protein chinasi R (PACT) negli umani, si lega a Dicer e contribuisce alla sua funzionalità. TRBP e PACT non sono essenziali per il clivaggio del pre-miRNA mediato da Dicer, ma lo facilitano, e in particolare TRBP stabilizza Dicer [21,22,12].

Queste proteine partecipano nella selezione dell'elica matura del miRNA e/o nel trasferimento del miRNAs allo step finale, cioè verso il RISC (RNA-Induced Silencing Complex), che media la degradazione o l'inibizione della traduzione del target (Fig. 3 e 5) [23,24]. Il core del RISC è composto da una famiglia di protein Ago [25,12]; delle quattro sottofamiglie delle proteine Ago presenti nei mammiferi, solo Ago2 possiede l'attività di clivaggio del target (detta slicer) [26]. La doppia elica composta da miRNA-miRNA* ha bisogno di essere separata per agire come guida nel riconoscimento tra RISC e il suo target ad mRNA. Recentemente, è stato osservato che Ago2 riceve direttamente il piccolo RNA a doppia elica dal complesso caricato da RISC (Fig. 4) [27,12].

Tuttavia rimane sconosciuto quando (prima o dopo il caricamento) ma soprattutto come le due eliche sono separate. Nei mammiferi, i miRNA guidano il RISC verso la complementarietà con i siti target dell'mRNA, dove endonucleotidicamente attiva la proteina Ago che taglia RNA [28].

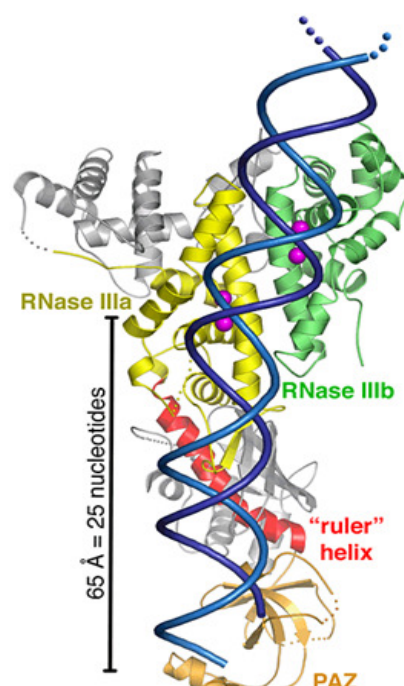


Figura 4 Immagine tridimensionale di Dicer

Altri miRNAs si legano con una parziale complementarietà ai siti target localizzati nel 3' UTR dei loro specifici target ad mRNA. L'imperfetto appaiamento delle basi tra i piccoli RNA e il loro target ad mRNA, causa la repressione della traduzione e/o deadenilazione (rimozione delle code poli A dal target), seguiti dalla destabilizzazione del target (Fig. 4) [29,12].

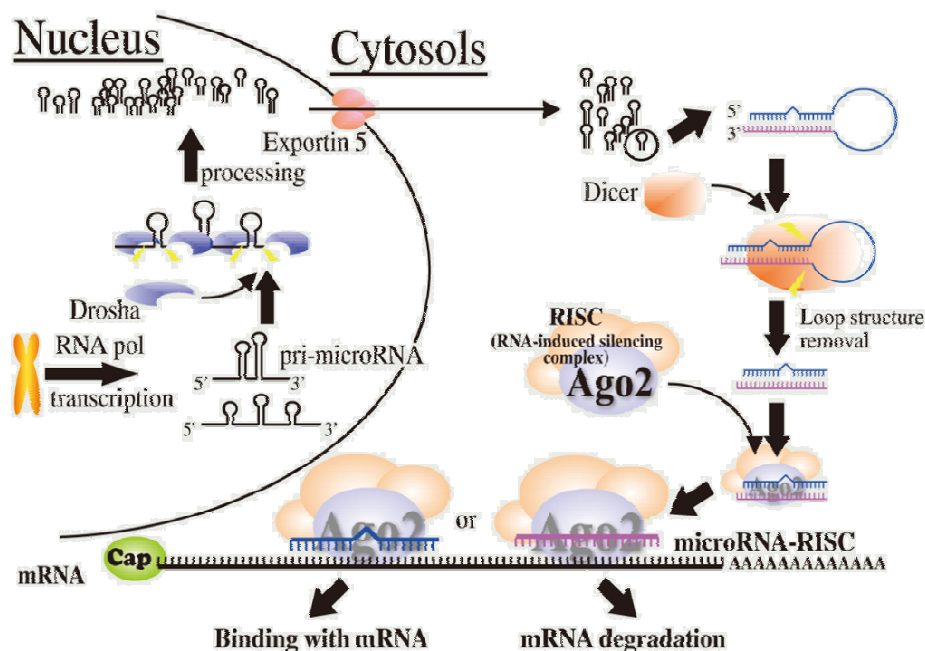


Figura 5 Meccanismi dei miRNA di silenziamento dell'mRNA target

Il meccanismo attraverso cui le protein Ago mediano la repressione della traduzione è ancora materia di dibattito. Le proteine Ago sembrano agire sull'iniziazione della traduzione [30], sull'elongazione [31], e sulla degradazione del polipeptide nascente [32], dipendente dal target regolato. Recentemente diversi gruppi hanno riportato che, sotto specifiche condizioni, i miRNA possono avere un effetto opposto, possono ad esempio attivare la traduzione dei loro target ad mRNA. Vasudevan et al. hanno evidenziato che Ago2 attiva la traduzione dei target ad mRNA durante l'arresto del ciclo cellulare causato dalla starvazione o per inibizione da contatto [33,34,35], dove fisiologicamente risulta repressa la traduzione dello stesso target ad mRNA nelle cellule proliferanti[35].

Ulteriori studi saranno necessari per comprendere i meccanismi molecolari coinvolti durante la repressione o l'attivazione tradizionale mediati da i miRNA e i meccanismi per invertire i due processi [3].

1.2 La Funzione dei MicroRNA

I miRNA esercitano la loro funzione attraverso una regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica; numerosi studi hanno infatti mostrato come un singolo miRNA può avere più di 100 target diversi ed è stato stimato che i miRNA sono in grado di regolare più del 30% dei geni codificanti per proteine (fig. 6) [36,5].

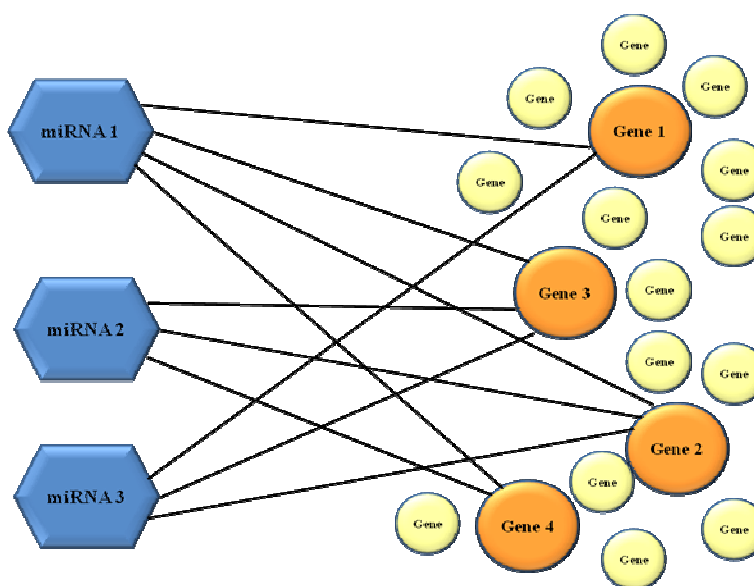


Figura 6 Un miRNA può riconoscere centinaia di geni diversi.
Un gene può essere riconosciuto da diversi miRNA

La regione più importante dei miRNA, dal punto di vista della specificità, per il riconoscimento dell' mRNA target, è localizzata nel 5'-terminale dello strand del miRNA maturo, lunga solitamente tra i 7 e i 10 nucleotidi, detta sequenza "*seed*". Tuttavia la regione seed non comprende il primo nucleotide presente al 5' del miRNA (solitamente una adenosina) che non risulta determinante per l'interazione con il target e può anche essere non appaiato (Fig. 7) [23,37].

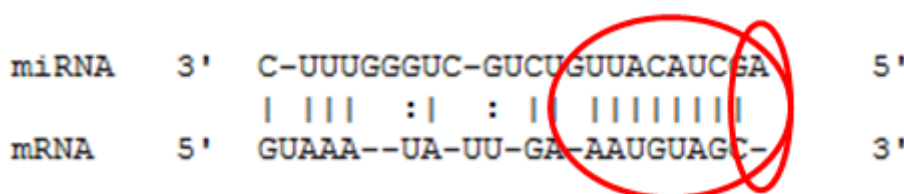


Figura7 Regione *seed* dei miRNA

Tuttavia la regione *seed* può presentare degli appaiamenti non corretti (mismatches) dovuti all'accoppiamento GU che disturbano il legame con l'mRNA, influenzando così la funzione del miRNA (Fig. 7) [38].

La regione a valle del *seed* presenta solitamente un bulge o un loop, mentre la regione all'estremità 3' del miRNA mostra solitamente una complementarità imperfetta col suo target (Fig. 7) [38].

Anche se il legame con i propri target sembra dovuto alla complementarità tra la regione *seed* presente al 5' dei miRNA e la sequenza UTR presente al 3' dei rispettivi mRNA, il meccanismo d'interazione miRNA-mRNA rimane ancora in parte sconosciuto[38].

La regolazione dell'espressione genica e della traduzione proteica, attraverso queste molecole di RNA non codificanti, avviene attraverso uno dei due meccanismi, dipendente dalla complementarità della sequenza *seed* dei miRNA con il suo target (fig. 8) [7]. Il primo meccanismo, prevede il legame del miRNA alla sequenza del mRNA codificante la proteina attraverso un perfetto appaiamento e questo induce il taglio dell'mRNA attraverso Argonata nel RISC (fig. 8e) [7]. Il meccanismo alternativo, che risulta essere anche il più comune attraverso il quale i miRNA regolano i loro geni target, è quello del legame imperfetto dovuto ad una parziale complementarità di sequenza nel 3' UTR del target codificante mRNA, guidando la repressione della traduzione della proteina (Fig. 8e) [39,40]. Tuttavia alcuni miRNA si legano all'open reading frame (ORF) o al 5' di alcuni geni target, e, in alcuni casi, possono attivare, piuttosto che inibire l'espressione genica (fig. 8e)[41,42]. Recentemente è stato anche riportato che i miRNA possono legarsi a ribonucleoproteine nella sequenza *seed* in maniera indipendente da RISC, interferendo con la loro funzione di legare RNA (attività decoy) (fig. 8f) [43,44]. Tre studi hanno riportato che i miRNA possono regolare l'espressione genica a livello trascrizionale legandosi direttamente al DNA o modulando i pattern di metilazione a livello dei promotori dei geni target (fig. 8g) [45,46,47]. Così i miRNAs possono ridurre i livelli proteici dei loro geni target senza alterare significativamente i livelli di mRNA, attraverso un controllo traduzionale[7].

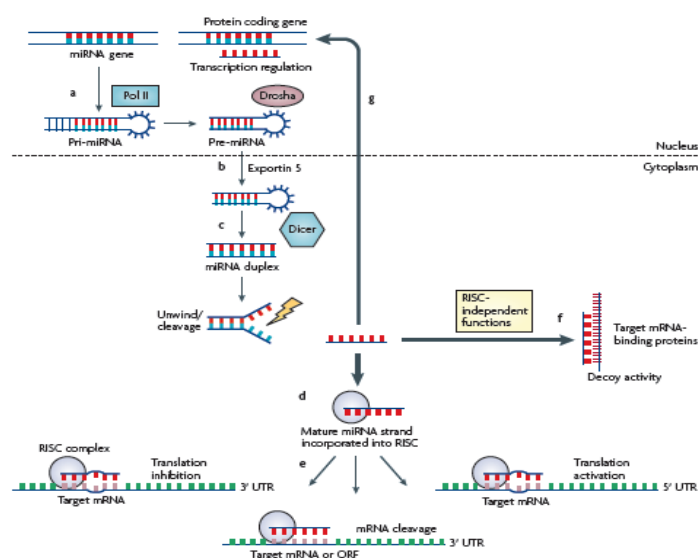


Figura 8 Le funzioni dei microRNA

1.3 Nomenclatura dei MicroRNA

Quando si dimostra che una sequenza corrisponde ad un unico miRNA, il miRBase Registry assegnerà un nome in accordo alle linee guida esistenti [48,49]. Nel database, una sequenza di 3 o 4 lettere descrive la specie, per esempio, “hsa” per *Homo sapiens*; tuttavia questo prefisso viene normalmente omissso in letteratura [50]. Il core del miRNA ha una desinenza detta “miR”, che denota la sequenza matura, seguita da un numero di identificazione unico, assegnato sequenzialmente [50]. Possono essere aggiunti dei suffissi letterali a quei miR che differiscono di solo 1 o 2 basi, come ad esempio miR-10b; la numerazione dei suffissi è assegnata ai miR che hanno la stessa sequenza ma che derivano da differenti trascritti primari [50]. Nel caso del microRNA maturo hsa-miR-146a-5p e hsa-miR-146b-3p, il suffisso di -5p o -3p è attribuito quando i miRNA maturi sono i prodotti di geni diversi, localizzati su differenti cromosomi, ma differiscono l’uno dall’altro solo per la posizione di 2 nucleotidi [50,51]. I miRNA maturi che hanno una sequenza identica, ma derivano da geni differenti gli viene aggiunto un suffisso numerico addizionale, per esempio hsa-miR-1-1 e hsa-miR-1-2, i cui loci genomici si trovano rispettivamente sul cromosoma 20 e 18 [51]. Ognuno dei due strand dello stelo dell’RNA duplex (miRNA/miRNA* duplex) rilasciati attraverso Dicer dal pre-miRNA può essere un miRNA maturo indipendente e sono denotati con il suffisso “5p” o “3p” che si riferisce alla loro localizzazione 5’ o 3’ nel pre-miRNA. Per esempio, il pre-miRNA del hsa-miR30a da origine al miRNA maturo hsa-miR-30a-5p e al hsa-miR-30a-3p [51]. Quando uno delle due varianti di miRNA, 5p o 3p, è meno abbondante, è spesso marcato con il suffisso “*”; così, hsa-miR-146b-5p può semplicemente chiamarsi hsa-miR-146b, mentre quello meno frequente hsa-miR-146b-3p si chiamerà hsa-miR146b* [51]. Il registro del miRBase mantiene la più recente desinenza per la nomenclatura [50].

1.4 MicroRNA e Cancro

Secondo quanto emerso negli ultimi anni, i miRNA sono in grado di regolare fondamentali processi biologici, come lo sviluppo, la differenziazione, l'apoptosi e proliferazione; per tale motivo è stato a lungo sospettato che l'espressione dei miRNA potesse essere deregolata nel tumore, e le anomalie a carico delle attività dei miRNA potessero guidare la tumorigenesi (Fig.9) [52].

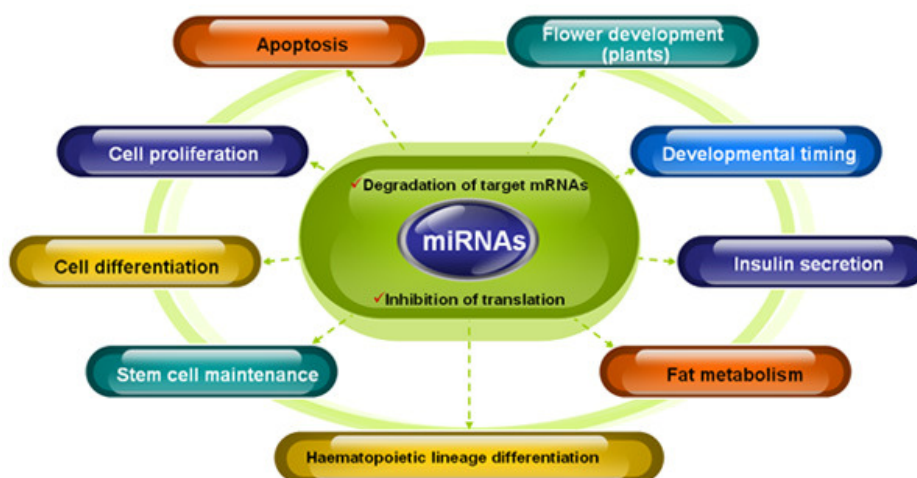


Figura 9 Meccanismi regolati dai MicroRNA

L'alterata espressione dei miRNA nel cancro è stata per prima documentata nella Leucemia Linfocitaria Cronica (CLL) [53]. Successivamente è stato osservato che l'espressione dei miRNA in diversi tipi di tumore risulta essere up- o downregolata rispetto al tessuto normale, supportando il loro complesso ruolo come oncogeni o oncosoppressori, sottolineando il significato biologico dei miRNA durante la progressione tumorale (Fig.10 e tab.1). [54,55].

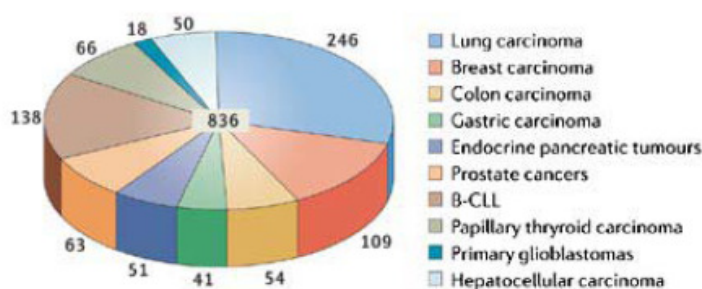


Figura 10 Diversa espressione dei miRNA in diversi tipi di tumori, rispetto ai corrispettivi tessuti sani

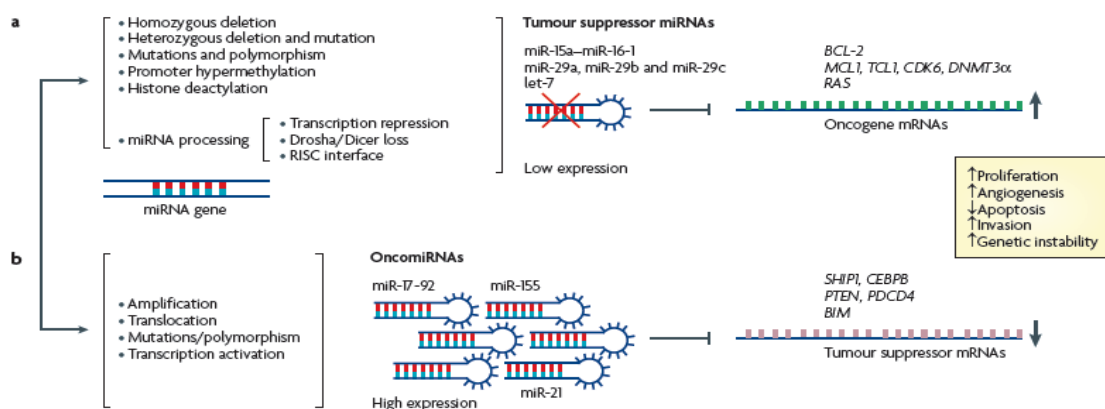
miRNA	Tipo di neoplasia	Espressione rispetto al tessuto normale
let-7a	Mammella	Diminuita
let-7a	Polmone	Diminuita
let-7e	Colon	Diminuita
mir-009-3	Colon	Diminuita
mir-010b	Mammella	Diminuita
mir-017	Colon	Aumentata
mir-020	Colon	Aumentata
mir-021	Mammella	Aumentata
mir-021	Mammella	Aumentata
mir-021	Colon	Aumentata
mir-021	Polmone	Aumentata
mir-023a	Colon	Aumentata
mir-023b	Colon	Aumentata
mir-024-1	Colon	Aumentata
mir-026a	B-CLL	Aumentata
mir-030a	Polmone	Diminuita
mir-030b	Polmone	Diminuita
mir-030d	Polmone	Diminuita
mir-103	Colon	Aumentata
mir-106	Colon	Aumentata
mir-107	Colon	Aumentata

miRNA	Tipo di neoplasia	Espressione rispetto al tessuto normale
mir-123	Polmone	Diminuita
mir-125a	Mammella	Diminuita
mir-125b-1	Mammella	Diminuita
mir-125b-2	Mammella	Diminuita
mir-128a	Colon	Diminuita
mir-138-2	Colon	Diminuita
mir-145	Mammella	Diminuita
mir-145	Colon	Diminuita
mir-145	Polmone	Diminuita
mir-150	B-CLL	Aumentata
mir-155	Linfomi	Aumentata
mir-155	Mammella	Aumentata
mir-186	B-CLL	Diminuita
mir-191	Colon	Aumentata
mir-210	B-CLL	Diminuita
mir-210	Polmone	Aumentata
mir-212	Colon	Diminuita
mir-213	B-CLL	Diminuita
mir-213	Mammella	Aumentata
mir-221	Colon	Aumentata
mir-223	Colon	Aumentata

G.Melino e G. Ciliberto Argomenti di Biologia Molecolare Società Editrice Universo, Roma

Tabella 1 Profilo di espressione dei miRNA in diversi tipi di tumori, rispetto ai corrispettivi tessuti sani

Il diverso profilo di espressione è stato osservato non solo tra i tessuti normali e i tessuti tumorali, ma anche nei tumori primari e nei tessuti metastatici [56]. Il profilo di espressione di una varietà di tumori provenienti da tessuti con un'origine embriologica comune, appare avere alterazioni simili, permettendo di intuire l'origine e la differenziazione dello stato del tumore e quindi un possibile strumento per la diagnosi e la prognosi [57,58,59]. Diversamente da quanto è possibile ottenere dal profilo di espressione dell' mRNA, analizzando i pattern di espressione dei miRNA è possibile classificare i tumori poco differenziati [55]. L'alterata espressione dei miRNA nel cancro può essere il risultato di differenti meccanismi, come anomalie cromosomiche, mutazioni genomiche e polimorfismi, cambiamenti epigenetici e alterazioni nella biogenesi dei miRNA (fig. 11) [52].

**Figura11** Diversi meccanismi possono alterare l'espressione dei miRNA; i loro effetti ricadono poi sui processi biologici

Più della metà di questi miRNA associati al cancro sono localizzati in regioni cromosomiali dette “hotspot”, come siti fragili, regioni di perdita di eterozigotà, amplificazioni o regioni di breakpoint [60,61]. Le alterazioni cromosomiche nei campioni tumorali possono causare un’alterata espressione dei miRNA, e quindi concorrere al processo di tumori genesi [52]. Mutazioni e polimorfismi nei trascritti dei miRNA possono avere effetti sull’espressione dei miRNA inducendo un’alterazione del processamento dei miRNA o dalla complementarità della sequenza [52, 62].

E’ stato riportato che i polimorfismi di un singolo nucleotide (SNP) nell’mRNA target, all’interno del sito di legame del miRNA, possono modulare la funzione dei miRNA attraverso la distruzione della complementarità dell’appaiamento delle basi tra miRNA e il target ad mRNA (fig. 12) [63].

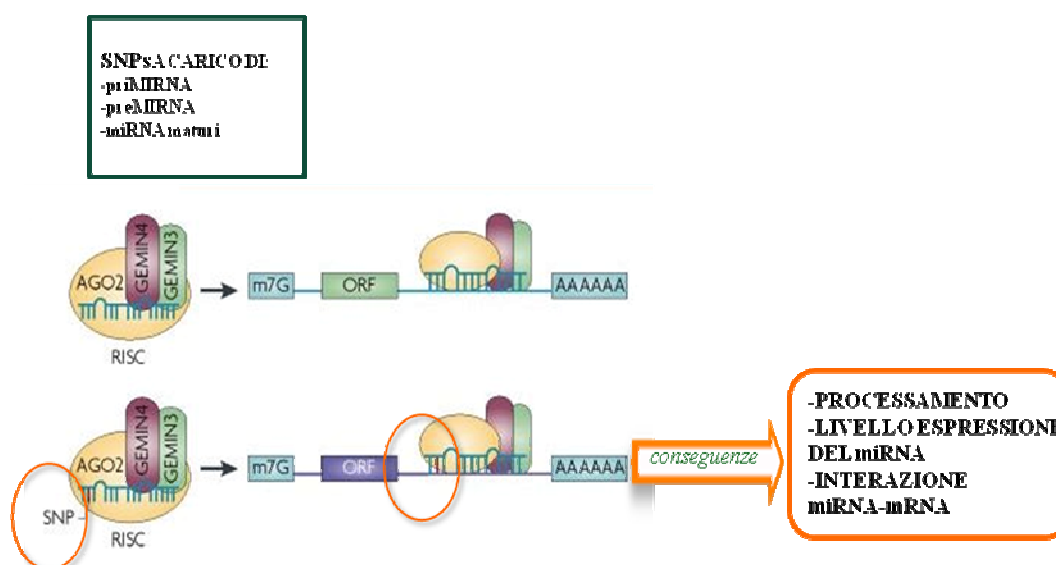


Figura12 SNP a carico del miRNA-mRNA target

Anche le modificazioni epigenetiche possono avere effetti sull’espressione dei miRNA. Infatti Saito e colleghi hanno osservato una downregolazione del miR-127 dovuta all’ipermetilazione del suo promotore nel tumore della vescica; questo miRNA è stato riespresso in risposta al trattamento con agenti ipometilanti, correlata ad una downregolazione dell’oncogene B-cell lymphoma protein-6 (BCL6), target del miR-127 [64]. Inoltre altri studi eseguiti su cellule tumorali di vescica e di mammella hanno dimostrato che inibendo l’azione dell’istone deacetilasi (HDAC) si ha un significativo impatto sull’espressione dei miRNA [65]. Tuttavia gli effetti degli inibitori dell’HDAC sembrano essere tessuto-specifici, come accade nell’espressione dei miRNA nelle cellule tumorali provenienti da polmoni non a piccole cellule [58]. Successivamente è stata dimostrata un’alterata espressione degli enzimi di processamento (Dicer e di Drosha) in diversi tipi di tumore rispetto al tessuto sano [52]; infatti la

downregolazione dell'espressione di Dicer e di Drosha ha effetti sulla biogenesi dei miRNA [66,67].

Un altro potenziale meccanismo di regolazione post-trascrizionale, in grado di introdurre un'ulteriore livello di diversità nell'espressione genica, è quello dell' RNA editing Adenosina a Inosina (A-I).

Questo tipo di processo viene catalizzato da una famiglia di enzimi nucleari noti come adenosina deaminasi attive sull'RNA (ADAR), che inducono la modificazione di un residuo di Adenosina in Inosina, cambiando una coppia di basi A-U in I-G, in punti selezionati sull'RNA [68].

Gli ADAR1 e ADAR2, riconoscono specificatamente l'imperfetta struttura duplex del RNA, principale caratteristica dei trascritti dei pri-miRNA e dei pre-miRNA (fig.13) [52]. Questo meccanismo di editing A-to-I sembra che accada nel 16% dei pri-miRNA umani, alterandone il processamento, e la loro attività (fig.13) [69,52,70].

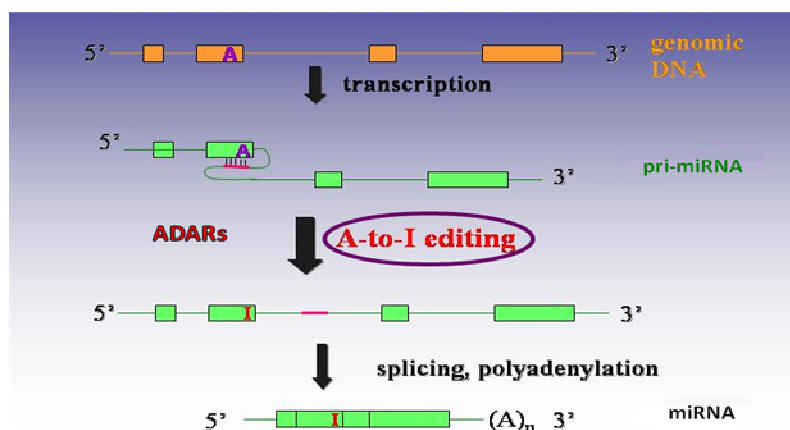


Figura 13 Editing dei microRNA

In alcuni casi, l'editing dei pri-miRNA svolge un ruolo nel controllo del meccanismo di processamento di queste molecole; infatti, il processo di editing A-to-I che avviene a livello di specifiche posizioni del miR-142 e del miR-151, blocca il taglio da parte di Drosha e Dicer durante la maturazione di queste molecole [71]. Il meccanismo di editing permette anche il silenziamento di un set di geni target differenti tra loro da parte di un singolo miRNA; ciò, oltre ad estendere la funzione di queste molecole, aumenta anche la complessità della loro analisi [72]. Inoltre questo meccanismo contribuisce alla diversità di queste molecole facendo sì che da uno stesso trascritto di miRNA vengano generate più molecole di miRNA [73].

L'attività di ADARs è critica per lo sviluppo embrionale ed è strettamente regolata in condizioni fisiologiche, e [74,75,76] in molti tipi di tumori sono stati trovati alterati livelli dell' RNA editing così come un alterato livello di espressione di ADAR [77]. Ulteriori analisi saranno necessarie per comprendere meglio l'impatto dell'RNA editing sulla funzione dei miRNA e l'esatto ruolo dell'editing dei miRNA nello sviluppo e nella progressione tumorale [52].

1.5 MicroRNA come Oncogeni e Oncosoppressori

Visto il ruolo dei miRNA nel regolare la proliferazione cellulare e l'apoptosi e visto che le cellule tumorali hanno un profilo di espressione dei miRNA distinto, è stato proposto che alcuni di essi possono essere funzionalmente coinvolti nell'iniziazione tumorale e nella progressione [52]. Questi miRNAs che possiedono una funzione come oncogeni o oncosoppressori sono chiamati "oncoMir" [9]. Lo studio dei target di questi miRNA suggerisce che alcuni di loro possono promuovere la crescita cellulare tumorale, attraverso l'inibizione di geni oncosoppressori o di geni che controllano la progressione del ciclo cellulare, la differenziazione o l'apoptosi; mentre altri possono indurre metastasi attraverso il targeting di geni coinvolti nei processi di transizione epitelio-mesenchimale e nell'invasività cellulare (fig. 14) [52]. Sebbene molti miRNA oncogenici possono aumentare il fenotipo maligno delle cellule tumorali, solo uno studio ha dimostrato che un singolo miRNA, *miR-155*, è sufficiente a promuovere la trasformazione de novo [52, 78].

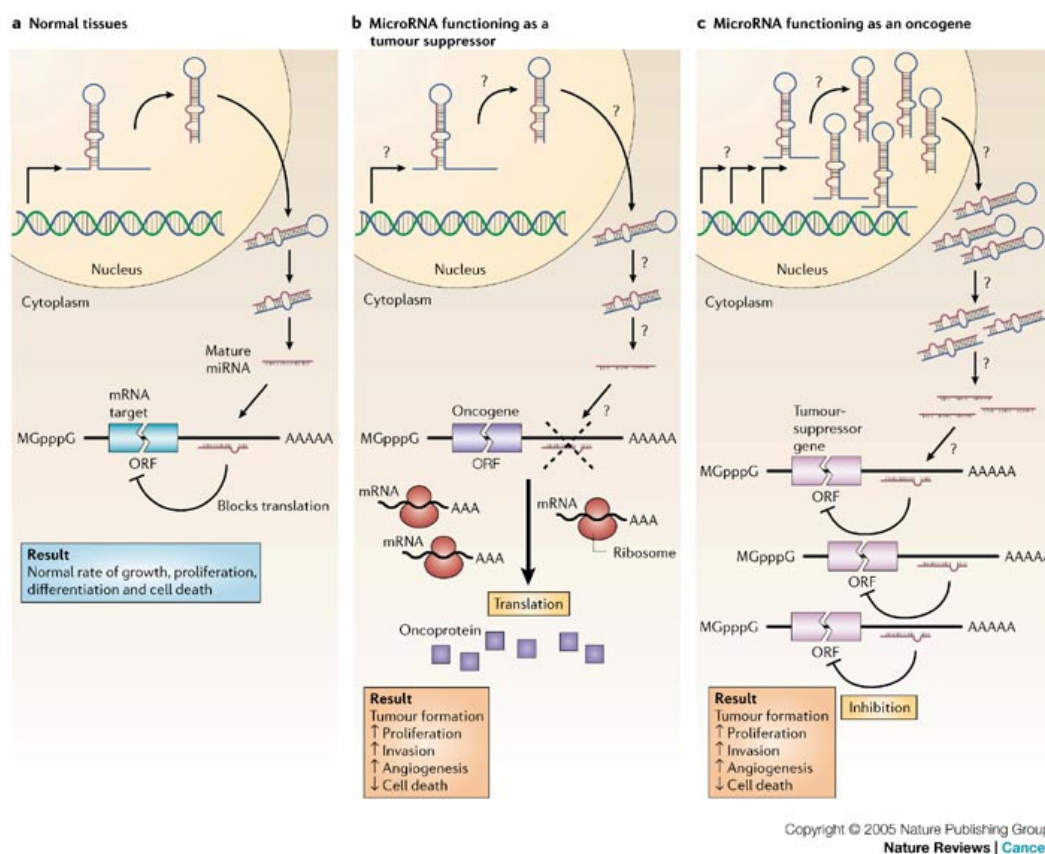


Figura 14 MiRNA con la funzione di oncogeni e oncosoppressori

Questo può essere coerente con il modello in cui i miRNA, piuttosto che silenziare, inducono l'espressione dei geni target [52]. Finora, il *miR-155* rappresenta l'unico esempio in cui un singolo miRNA è sufficiente a indurre la tumorigenesi. L'overespressione del *miR-155* nei topi

transgenici induce una preleucemia causata dalla proliferazione di cellule pre-B che progredisce in leucemia a cellule B e a linfoma ad alto grado [78]; Coerentemente con la sua attività oncogenica, l'alta espressione del *miR-155* è stata riportata in diversi tipi di tumori ed è stato dimostrato che nel tumore del polmone correla con una prognosi peggiore, nel linfoma causa una diffusione delle cellule B grandi, ed è indice di maggiore aggressività nella CLL [79]. Un altro esempio di oncomiR è il *miR-17~92*, un cluster di miRNA il cui locus genico è spesso amplificato nei tumori; se il cluster del *miR-17~92* ha come targets diversi geni coinvolti nei pathway apoptotici, è evidente che se la sua attività di silenziare questi target ad mRNA causa degli effetti antiapoptotici [80,81]. Tra i miRNA oncogenici può essere incluso anche il *miR-21*, dove la sua overespressione nei glioblastomi, nei tumori pancreatici, nei tumori della mammella e nei tumori epatocellulari promuove la proliferazione e la meta statizzazione [82,83]. Altri come *miR-372* e *miR373* possono neutralizzare l'inibizione di CDK mediata da p53 e cooperare con Ras alla trasformazione cellulare (tab.2) [84].

OncomiRs

miRNA gene	Localization	miRNA target	Dysregulation in cancer	Reference(s)
<i>miR-155</i>	21q21.3	Shp c/EBP β Pu.1 Ctcl1 Pcalm	Upregulated in pediatric Burkitt's lymphoma, Hodgkin's disease, non-Hodgkin's lymphoma, and CLL, as well as breast, lung, colon, and pancreatic cancer	30-35, 55, 89
<i>miR-21</i>	17q23.1	PTEN PDCD4	Overexpressed in breast, lung, prostate, gastric, cervical, head and neck, and colorectal cancer, as well as glioblastoma	36-42, 55, 56, 89, 93, 95, 97
<i>miR-221&222</i>	Xp11.3	PTEN TIMP3 p27 p57 Bim DDIT4 FOXO3A	Upregulated in hepatocarcinoma, CLL, melanoma, and glioblastoma, as well as lung, breast, thyroid, and prostate cancer	43-50, 94
<i>miR-106b-93-25 cluster</i>	7q22.1	P21/Cip1 Bim	Overexpressed in gastric, prostate, colon, and pancreatic cancer, as well as neuroblastoma and multiple myeloma	51
<i>miR-17-92 cluster</i>	13q31.3	p63 E2F1 P21 Bim	Upregulated in lung and colon cancer, as well as lymphoma, medulloblastoma, and multiple myeloma	52-54, 57, 58, 99

Garofalo et al. Therapeutics in Cancer. Annu Rev Pharmacol Toxicol.2010

Tabella 2 I microRNA più upregolati tra i tumori umani riportati. CLL Leucemia linfatica cronica

In contrasto ai miRNA oncogenici, esistono miRNA con la funzione di oncosoppressori con la capacità di silenziare oncogeni e/o geni che inibiscono la differenziazione cellulare o l'apoptosi (fig. 14); normalmente nei tumori questi miRNA oncosoppressori risultano essere down regolati [52]. Tra i miRNA con funzione di oncosoppressori c'è *let-7* [85], che inibisce Ras e HMGA2; *miR-15a* e *miR-16-1* [53], invece inibiscono BCL2; il *miR-34* [54], che è indotto dal danneggiamento del DNA e da stress oncogenici in maniera p53-dipendente, guida l'apoptosi o alla senescenza cellulare (tab. 3).

Table 2 Tumor suppressor miRNAs

miRNA gene	Localization	miRNA target	Dysregulation in cancer	Reference(s)
<i>miR-15/16</i>	21q21.3	Bcl-2 CCND1 WNT3A	Downregulated in CLL, DLBCL, multiple myeloma, pituitary adenoma, prostate cancer, and pancreatic cancer	27, 59–63
<i>let-7</i>	17q23.1	Ras Myc HMGA2	Downmodulated in liposarcoma and CLL, as well as gastric, lung, prostate, breast, ovarian, and colon tumors	64–66, 76
<i>miR-34a/b/c</i>	Xp11.3	CCNE2 MET Bcl2 MycN Notch1/Notch2 CDK4/6	Downregulated in pancreatic cancer and Burkitt's lymphoma without Myc translocation Hypermethylated in colon tumors	67–70
<i>miR-29</i>	7q22.1	Mcl-1 CDC42	Downmodulated in CLL and cholangiocarcinoma, as well as colon, breast, and lung cancer	71, 72, 74
<i>miR-122</i>	13q31.3	ADAM17	Downregulated in HCC	73

Garofalo et al. Therapeutics in Cancer. Annu Rev Pharmacol Toxicol.2010

Tabella 3 MiRNA oncosoppressori: i microRNA più downregolati nei tumori umani.
CLL Leucemia Linfatica cronica; DLBCL Linfoma a cellule B grandi diffuse; HCC carcinoma epatocellulare.

1.6 MicroRNA e Polimorfismi

Un pri-miRNA comprende uno stelo (stem di ~33bp) con un loop terminale e sequenze fiancheggianti (~100bp) [86]. Diversi studi hanno dimostrato che una parte del loop terminale [87,88], e le sequenze fiancheggianti lo stem loop [89] sono critiche per il processamento indotto da Drosha e Dicer. E' stato ipotizzato che i polimorfismi nei pre-miRNA possono influenzare la maturazione del miRNA e quindi modularne la sua espressione [86]. In un lavoro, Duan et al (2007) hanno analizzato un polimorfismo (SNP), in particolare rs1297533, localizzato nell'ottavo nucleotide all'interno della sequenza matura del *miR-125a*. Questo SNP blocca *in vitro* il processamento del pri-miRNA in pre-miRNA, causando un'alterazione della soppressione indotta dal *miR-125a* sul suo target ad mRNA, *Lin-28*. La conseguenza biologica di questo SNP sul miR-125 necessita di ulteriori studi [90]. In uno studio simile di Saunders et al del 2007, solo su tre miRNA (*miR-125a*, *miR-627* e *miR-662*) sono stati trovati SNP all'interno della regione seed (rs12975333, rs2620381 e rs9745376). Secondo questo studio, i geni dei miRNA hanno una bassa densità di polimorfismi e la maggior parte di quelli identificati non sono all'interno della regione seed, indicando una forte selettività nei pre-miRNA umani. Nessuno di questi polimorfismi è stato testato sperimentalmente per determinare se questi SNP potessero avere effetti sulla struttura o sul processamento dei miRNA [91]. Dal recente studio di Jazdzewski et al. del 2008 è stato dimostrato come un comune SNP, rs 2910164, a carico del pre-miR-146a riduce *in vitro* i livelli di espressione del miR-146 maturo, contribuendo alla predisposizione genetica al carcinoma papillare della tiroide [92].

Dettagliate analisi sulla sequenza matura dei miRNA hanno rilevato un alto grado di variazione nei nucleotidi terminali confrontati con le attuali sequenze di riferimento presenti nel miRBase [93,94,95,96,97,98]. Queste varianti di popolazione conosciute nei miRNA sono chiamate isomiR. Secondo tutti gli studi citati precedentemente, nella maggior parte dei casi si ha una modificazione generata da un singolo nucleotide nel 3' terminale del miRNA che differisce dalla sequenza genomica. In contrasto, al 5' terminale le basi sono più omogenee, con solo pochi casi di varianti (fig 15) [99,96]. Questi risultati predicono che una variante di sequenza dei miRNA può generare numerosi miRNA maturi; tuttavia alcune varianti potrebbero influenzare il processamento dei miRNA, l'emivita, le localizzazioni subcellulari e la specificità con il target dei miRNA (in particolare le variazioni al 5' terminale) [86]. La termodinamica delle interazioni tra RNA-RNA gioca un ruolo essenziale nel legame del miRNA con il loro target ad mRNA; quindi è stato proposto che SNP a livello dei siti di legame dei miRNA possono alterare l'espressione dei geni target. La densità di polimorfismi è significativamente più bassa nelle regioni dei siti conservati dei target che sono complementari alla regione seed del miRNA

[100]. SNP in questa regione possono essere funzionali e sono candidati ad essere la causa di malattie umane.

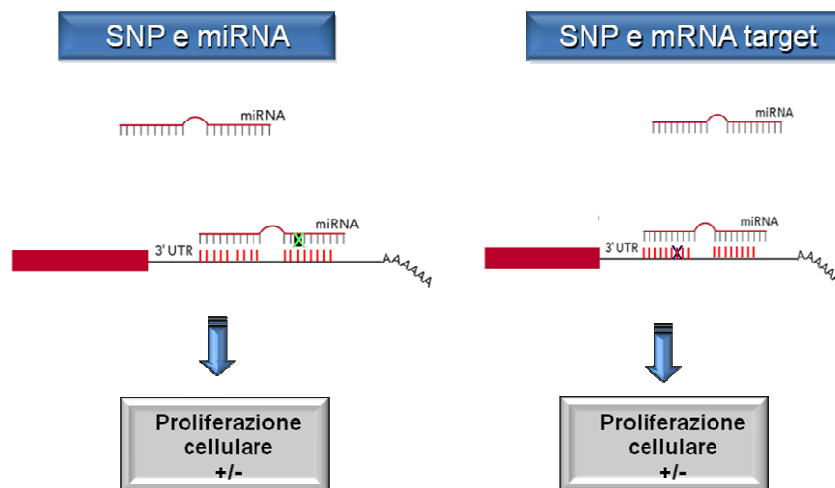


Figura 15 SNP a carico della sequenza dei miRNA o a carico della sequenza dell'mRNA target possono causare alterazioni tra il riconoscimento miRNA-mRNA e causare alterazioni a livello dei meccanismi cellulari

Tramite programmi bioinformatici, diversi studi hanno analizzato SNP all'interno del 3'UTR dei geni target umani, cercando di predire quali SNP potrebbero alterare i siti per il riconoscimento del miRNA sul target ad mRNA, alterandone di conseguenza i livelli di espressione (fig.15) [101,100,102,103]. Secondo diversi studi è emerso che il 3'UTR sia un "hotspot" per le patologie [104], e quindi le caratteristiche dei microRNA possono essere utili per la distinzione tra vari tipi di tumori e malattie, emergendo sempre di più il loro possibile ruolo come marker patologici [105]. Tra i 120000 SNP conosciuti sul 3'UTR dei geni target, 19913 modificano i presunti target dei miRNA o attraverso la distruzione del sito conservato del target predetto o attraverso la distruzione di siti non conservati predetti o attraverso la creazione di nuovi siti target predetti (<http://www.patrocles.org>)(tab.4) [102].

Table 1. SNPs in experimentally verified human miRNA targets

Target gene	miRNA	Target sequence	SNP	Frequency category	HapMap panel frequency, CEU/HCB/JPT/YRI	Evidence	Conservation
<i>LDLRAP1</i>	mir-124	G[T/G]GCCTTT	rs11583293	n/a	—	a	M, R, D, O
<i>SLC16A9</i>	mir-1/-206	TCATTCC[G/A]	rs2893808	0	0.0/0.0/0.02/0.0	a	M, D, O
<i>SDC4</i>	mir-1/-206	TCATT[G-]CT	rs11475489	n/a	—	a	M, R, D, O
<i>CD24</i>	mir-93/-302/-372/-373	AGCACT[T/A]A	rs4030414	n/a	—	a	None
<i>ATP6V0E</i>	mir-124	ATGCCT[T/C]A	rs11539178	n/a	—	a, b	None
<i>POLR2K</i>	mir-1/-206	ACATT[C/T]CA	rs11555067	n/a	—	a	None
<i>DVL2</i>	mir-124	CT[G/A]CCCTTT	rs1054280	n/a	—	a	M, R
<i>IQGAP1</i>	mir-124	CTGCCTT[T/A]	rs1042538	2	0.10/0.41/0.42/0.09	a, c	D, O
<i>MYH9</i>	mir-124	GTG[C/G]TTA	rs8226	n/a	—	a	M, R, D, O, C
<i>MKRN1</i>	mir-93/-302/-372/-373	G[G/C]CACCTT	rs17620927	0	0.0/0.0/0.0/0.0	a	M, R, D, O
<i>EZH2</i>	mir-101	GTACTG[T/G]A	rs8829	n/a	—	c	M, R, D, O, C, X
<i>TTC7A</i>	mir-124	GTGCCT[T/C]T	rs28635788	n/a	—	a	M, R, D
<i>TTC7A</i>	mir-124	GTGCCTT[T/C]	rs10196117	n/a	—	a	M, R, D
<i>CAV1</i>	mir-124	AT[G/A]CCCTA	rs11553391	n/a	—	a	D
<i>ACAA2</i>	mir-124	TTG[C/G]CTTA	rs7233791	2	0.05/0.11/0.14/0.19	a, b	M, R, O
<i>KLHDC5</i>	mir-1/-206	A[C/T]ATTCCC	rs1050288	2	—	a	M
<i>MTPN</i>	let-7/mir-98	GTA[C/T]CTCA	rs17168525	2	0.01/0.19/—/0.0	c	M, R, D, O

• M.A. Sanders, et al. PNAS, 2007

Tabella 4 SNP nei target ad mRNA identificati sperimentalmente

Quindi, per concludere possiamo dire che, polimorfismi a carico del miRNA, o a carico del gene target, possono guidare alla perdita o all'acquisizione della funzione del miRNA, a seconda se lo SNP interferisce, elimina o crea un sito di legame tra il miRNA e il target. L'alterata funzionalità dei miRNA a causa degli SNP, può avere ripercussioni in vari processi biologici, interferendo su molte delle funzioni cellulari, tra cui la farmaco sensibilità o la farmaco resistenza, o la tossicità di un farmaco (fig. 16) [105].

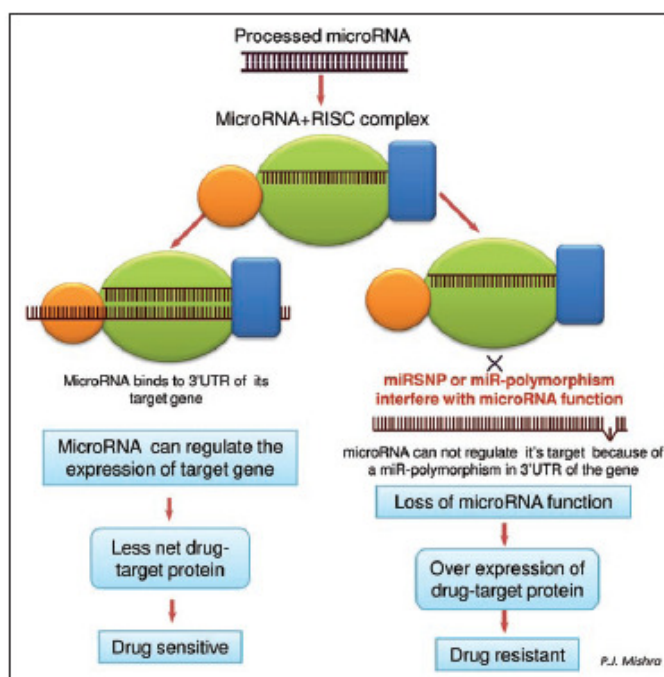


Figura 16 Uno SNP a carico del miRNA o dell'mRNA target può avere effetti sulla risposta ai farmaci

1.7 Controllo Epigenetico dei Geni MicroRNA

Considerando l'importanza dei miRNA nel controllare tutti gli stadi fisiologici della cellula, non sorprende che la loro espressione abbia bisogno di una regolazione, e questo avviene anche attraverso un controllo epigenetico [106]. Negli ultimi anni, diversi studi hanno valutato la rilevanza dei cambiamenti nelle modificazioni della cromatina e il loro impatto sul controllo trascrizionale di un certo numero di geni codificanti i miRNA [107]. Come accade per i geni codificanti-proteine, un'alterazione dei pattern di metilazione delle isole CpG vicino o all'interno dei geni dei miRNA o la modificazione istonica, può causare una inattivazione dell'espressione dei miRNA e infine indurre alterazioni patogeniche, inclusa la tumorigenesi [108]. In supporto a questo, lo studio di Iorio et al (2007) ha evidenziato un'alterata espressione di diversi miRNA nel tumore dell'ovaio dovuti alla ipometilazione di alcuni geni codificanti per i miRNA, tra questi ci sono i *miR-21*, *miR-203* e *miR-205* [109]. In un altro studio, Lujambio e i suoi collaboratori(2007), hanno confrontato le linee cellulari tumorali di colon HCT-116 con le stesse linee cellulari in cui sono stati silenziati (doppio knockout, DKO) la DNA Metiltransferasi di tipo1 e la 3b e hanno evidenziato che il 6% dei 320 miRNA analizzati sono stati upregolati di circa tre volte rispetto alle linee cellulari DKO [110,111]. Tra i miRNA risultati upregolati, solo il *miR-124* ha al suo interno un'isola CpG densamente metilata nelle linee cellule tumorali ma non nei tessuti sani, dimostrando che questo miRNA è regolato da un controllo epigenetico [110]. Successive analisi hanno evidenziato che il *miR-124* è frequentemente metilato in altre linee cellulari provenienti da tumori del colon, mammella e polmone, così come nelle leucemie e nei linfomi [111;] ed è stato osservato che, l'ipermetilazione delle isole CpG nel *miR-124* è concomitante con inattivazione della modificazione istonica [111]. Da altri recenti studi sulla metilazione dei geni dei miRNA, è stato dimostrato che l'ipermetilazione dei *miR-9-1*, *miR-124a3*, *miR-148a*, *miR-152* e *miR-663* va dal 34-66% dei pazienti analizzati affetti da tumore della mammella [112]. L'ipermetilazione è un fenomeno che accade piuttosto precocemente nello sviluppo tumorale ed è associata con una marcata riduzione dell'espressione dei miRNA nel tessuto tumorale [106]. Anche altri miRNA, come *miR-193a*, *miR-137*, sono stati trovati ipermetilati e downespressi in diversi tipi di tumori; la loro ectopica espressione induce una riduzione della crescita cellulare e downregolano fattori chiave della proliferazione, dimostrando che questi 2 miRNA possiedono caratteristiche simili agli oncosoppressori, caratteristiche che vengono silenziate epigeneticamente durante la progressione tumorale [113,114]. I promotori dei geni dei miRNA sono anche regolati dalla modificazione degli istoni durante lo sviluppo e la patogenesi; per esempio, la bassa espressione del *miR-1* nelle cellule tumorali polmonari può essere ripristinata attraverso il trattamento con inibitori delle istone deacetilasi (HDAC), suggerendo che il

promotore di *miR-1* nel tumore potrebbe avere un'acetilazione aberrante [115]; ripristinando l'espressione del *miR-1* si è stata osservata una riduzione della crescita cellulare, della mobilità e della tumorigenesi *in vivo* [115]. Quindi, gli inibitori delle HDAC, hanno il potenziale per promuovere la downregolazione di alcuni miRNA [115].

1.8 Controllo dell'Espressione dei MicroRNA attraverso Farmaci Epigenetici

I farmaci che vanno ad inibire l'istone deacetilasi di classe I e II (HDACi) inducono cambiamenti drastici nella programmazione cellulare, nel promuovere l'arresto della crescita, nella differenziazione e nell'apoptosi, funzionando come agenti antitumorali [116]. Sebbene il loro dettagliato meccanismo molecolare di azione rimane ancora sconosciuto, sembra che il 5-10% dei geni trascritti sia up o downregolato successivamente al trattamento con HDACi [117]. Il motivo per cui solo una sottopopolazione di geni dopo il trattamento con HDACi cambia il livello della sua espressione, rimane un mistero; tuttavia dal lavoro di Scott et al (2006) sulla linea cellulare proveniente dal tumore alla mammella, SKBr3, è stato osservato che i geni dei miRNA possono essere rapidamente alterati e altamente sensibili all'azione degli HDACi [65]. Infatti in questo studio è stato confrontato il profilo di espressione di 200 miRNA nelle cellule SKBr3 non trattate e nelle cellule SKBr3 trattate con un potente HDACi, LAQ824; dai loro risultati risulta che nelle cellule non trattate il 40% dei miRNA analizzati mostravano una upregolazione; di questo 40%, 64 miRNA (80%) [65] avevano subito una significativa downregolazione successivamente al trattamento per 5 ore con gli inibitori delle HDAC [65]. In particolare, il *miR-27a*, dopo il trattamento con gli inibitori delle HDAC, viene fortemente represso ed induce una upregolazione dei suoi geni target [65].

Tuttavia è stato dimostrato che i farmaci che modificano la cromatina possono alterare i pattern di espressione di alcuni miRNA; infatti gli autori hanno combinato l'azione di inibitori della metilazione del DNA e di inibitori dell'istone deacetilasi per indurre l'espressione di particolari miRNA [64]. In un altro lavoro è stato osservato che trattando simultaneamente le cellule provenienti dal carcinoma della vescica T24 con la 5-Aza-2'-deossicitidina (5-Aza-CdR o DAC, un farmaco modificante la cromatina), e con l'acido 4-fenilbutirico (PBA, un HDACi) si ottiene un'upregolazione maggiore di 3 volte nel 5% dei 313 miRNA analizzati [65]. Tra i miRNA upregolati, l'effetto più forte è stato visto per il miR-127 (~50 volte upregolato), che è inserito in un'isola CpG; normalmente questo miRNA viene silenziato nelle cellule tumorali ed ha come target potenziale il proto-oncogene BCL6 [65]. Così la combinazione dell'azione degli agenti demetilanti e degli inibitori delle istone deacetilasi ha indotto l'attivazione del miR-127 che normalmente è soggetto a silenziamento epigenetico nel tumore, e può agire, una volta attivato, come oncosoppressore silenziando BCL6 [65]. Sempre dallo studio di Scott et al (2006), il miR-127 risulta espresso insieme a 4 altri miRNA (miR-136, miR-431, miR-432 e miR-433) nel tessuto sano, mentre questo cluster di miRNA risulta essere silenziato nel cancro. L'unico miRNA, che dopo il trattamento combinato con 5-Aza-CdR e PBA delle cellule tumorali, sembra ripristinare la sua espressione, è il miR-127, suggerendo che il controllo epigenetico

possa differenzialmente agire rispetto ai miRNA che sono clusterizzati negli stessi loci genomici e normalmente processati da un singolo grande trascritto [65]. La riespressione del miR-127 dopo il trattamento è associata con una diminuzione dei livelli di metilazione e da un incremento dell'acetilazione degli istoni intorno allo specifico sito di trascrizione contenuto all'interno del miR-127 [65]. Queste caratteristiche sono tipiche della cromatina aperta e quindi di trascrizione genica attiva, indicando che l'isola CpG può diventare un promotore attivo della trascrizione per singoli miRNA nelle cellule tumorali [65]. In un altro studio, l'uso della sola 5-Aza-CdR è sufficientemente potente da riattivare l'espressione di miRNA downregolati nel tumore della mammella, come nel caso del miR-9-1 [112]. Comunque l'uso di agenti demetilanti è efficace a restaurare la funzionalità del miR-223 e la mielodifferenziazione; il silenziamento epigenetico di questo miRNA nella leucemia è stato revertito con la 5-Aza-CdR (Fig. 17) [118].

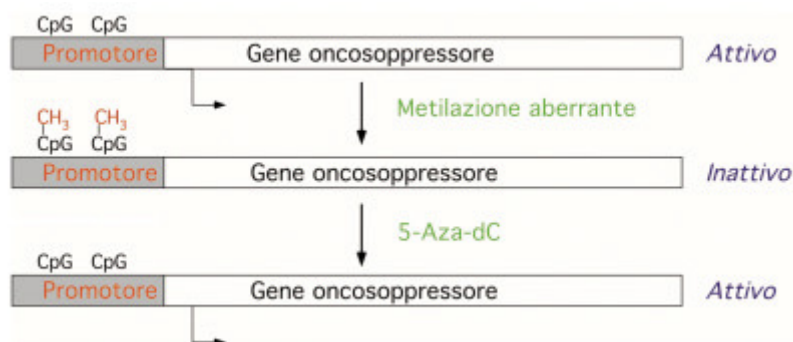


Figura 17 Riattivazione genica da parte della 5-aza-dC.

1.9 MiRNA come Biomarcatori Tumorali

Risulta sempre più evidente come i miRNA si possono identificare come nuovi possibili indicatori diagnostici, prognostici e come potenziali target terapeutici, grazie alle loro capacità di modulatori dell'espressione genica [7]. Oltre alla loro tessuto-specificità, i miRNA hanno caratteristiche uniche, che li rendono ideali marker tumorali data la loro stabilità, la facile rilevazione e una dimostrata associazione con i parametri prognostici e clinicopatologici [7]. Il riconoscimento dell'eccezionale stabilità dei miRNA nei tessuti viscerali, ha indotto gli studiosi a stabilire se queste piccole molecole sono anche preservate, rilevabili e quantificabili nel sangue e in altri fluidi biologici (urine, saliva ecc.) [7]. Infatti, negli ultimi due anni sono state accumulate molte evidenze a supporto dei miRNA circolanti come biomarcatori dello stato di malattia non invasivi e sensibili, soprattutto per quanto riguarda il cancro (mammella, polmone, pancreas, ovaio e prostata) [7]. Questo nuovo approccio dei miRNA circolanti come biomarcatori ha un immenso potenziale per la diagnosi tumorale precoce e stratificazione della malattia, in particolare per quei tumori in stadi avanzati e per quelli in cui non esistono marker tumorali al momento disponibili [7]. Lo studio dell'espressione dei miRNA nei tessuti tumorali e nei fluidi biologici ha permesso di considerarli come possibili marker visto il loro ruolo nei diversi tipi di tumore [7].

1.10 MicroRNA come potenziale Target Terapeutico

Molti studi hanno dimostrato che i miRNA possono rappresentare un nuovo target terapeutico per il cancro [52], questo anche grazie alla comparsa di nuove tecnologie che utilizzano miRNA sintetici o siti target artificiali per attivare o inibire la regolazione endogena dei miRNA [3]; le strategie terapeutiche sono basate sulla modulazione dell'espressione dei miRNA [3,119]. Per i miRNA con capacità oncogeniche, la terapia prevede l'uso o di oligonucleotidi anti-miRNA (AMO o LNA), o di microRNA sponges, o di miRNA masking, o piccole molecole inibitorie, dette microRNA MIMICS [52,3,119].

Per quanto riguarda gli AMO, questi sono capaci di bloccare l'interazione tra miRNA e il loro target ad mRNA attraverso una competizione; mentre gli LNA sono RNA che presentano un ribosio bloccato chimicamente con una conformazione ad alta affinità per RNA analogo, rendendolo inaccessibile [52,120,121,119]. Diversi studi hanno suggerito che gli AMO possono essere promettenti reagenti per il trattamento tumorale attraverso la soppressione di miRNA oncogenici [83,122].

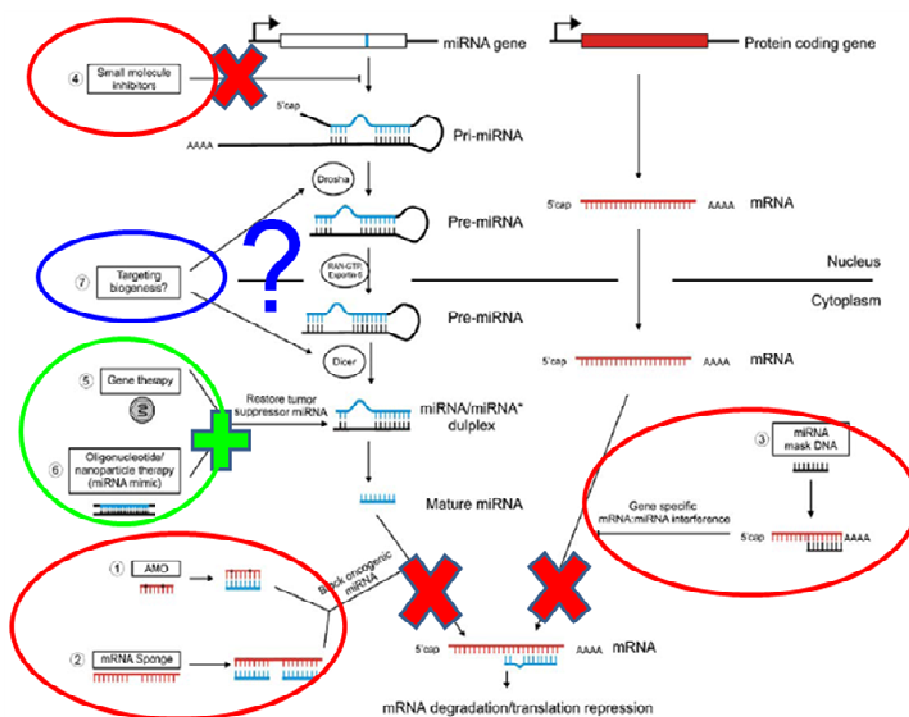


Figura 18 Schema delle strategie terapeutiche: 1. oligonucleotidi anti-miRNA (AMO) si lega ai miRNA, inibendo il legame del miRNA con mRNA target; 2. mRNA sponges contiene multipli siti di legame per specifici miRNA che prevengono il legame di questo miRNA con il suo target endogeno; 3. miRNA mask DNA è complementare al sito di legame del miRNA, causando nel gene specifico del target un'interferenza tra l'interazione miRNA:mRNA; 4. Piccole molecole inibitrici per uno specifico miRNA; 5.6. terapia genica usando un sistema virale e nanoparticelle che aumentano l'espressione di specifici miRNA oncosoppressivi per ottenere l'effetto terapeutico. 7. Usare come target molecole coinvolte nella biogenesi, ma rimane da essere ulteriormente valutata a causa degli effetti.

I microRNA sponges, sono mRNA sintetici contenenti siti di legame multipli per un miRNA endogeno, prevenendo l'interazione tra miRNA e il suo target endogeno; queste molecole sono state create da Elbert et al. (2007) inserendo un protuberanza tra il sito di legame per il microRNA e la posizione normalmente tagliata da Argonauta 2, permettendo quindi il legame del microRNA sponges con il complesso microribonucleoproteico caricato con il corrispondente microRNA [123,119]. Un singolo microRNA sponges, può essere usato per reprimere un'intera famiglia di miRNA seed [123]. *In vitro*, questi "sponges" reprimono il miRNA target, tuttavia, l'efficienza della stabilità espressa dalle applicazioni degli sponges *in vivo* deve essere valutata [123]. Analogamente ai miRNA endogeni, l'azione degli AMO è sequenza specifica ma non gene specifica; per questo gli AMO possono suscitare effetti anche su altri target, causando un'indesiderata tossicità [52,3]. Sono state create delle nuove molecole dette "miR-Mask" caratterizzate da sequenze con una complementarità perfetta al sito di legame per un miRNA endogeno nel gene target, capaci di formare un duplex con l'mRNA target ad alta affinità, bloccando l'accesso del miRNA endogeno al suo sito di legame, senza il potenziale effetto di degradazione dell'mRNA attraverso gli AMO [124,119]. L'efficacia terapeutica dei miR-Mask dipende dalla selezione del gene target; la scelta di avere come bersaglio degli oncogeni o degli oncosoppressori è critica [52]. Le piccole molecole inibitrici possono essere utili per analizzare la funzione di un miRNA, ma anche come promettente reagente per aumentare la risposta ai chemioterapici o da usare proprio come farmaco antitumorale [52,119]; *in vivo*, l'efficienza di piccole molecole inibitrici devono essere esplorate [52].

Da quando è stato notato che proteine codificate da oncosoppressori possono inibire la crescita tumorale, diversi lavori hanno ipotizzato che restaurando i miRNA con funzione oncosoppressiva si possono avere effetti antitumorali [125,126,127,119];

quindi la strategia terapeutica per la riattivazione dei miRNA oncosoppressori prevede l'espressione forzata di questi miRNA [52,3,119]. In un modello animale affetto da carcinoma epatocellulare (HCC) è stato somministrato il *miR-26a* usando virus adeno-associati (AAV), ed è stata osservata un'inibizione della proliferazione cellulare tumorale, stimolando un apoptosi tumore-specifica, e una protezione dalla progressione della malattia senza tossicità [128]. Poiché i vettori AAV non si integrano nel genoma dell'ospite, e quindi verranno eliminati, questo approccio minimizza i rischi della tossicità collegata al vettore [52]. Questo studio suggerisce che reintroducendo l'espressione di quei miRNA altamente espressi e tollerati nel tessuto normale ma non espressi nelle cellule tumorali si può ripristinare l'attività dei miRNA oncosoppressori come terapia antitumorale [52]. L'efficacia *in vivo* della terapia con vettori AAV è stata efficace contro il tumore del fegato, ma l'efficacia contro tumori solidi originati da altri tessuti deve essere valutata [52]. Poiché la perdita dell'effetto inibitorio di un miRNA può contribuire all'attivazione di oncogeni, è possibile inibire l'espressione dell'oncogene alterato attraverso l'uso di miRNA mimic sintetici [3].

I miRNA mimic, piccole molecole ad RNA ds modificate chimicamente, sono capaci di mimare le molecole di miRNA mature endogene [52].

Per ottenere un effetto terapeutico durevole, questi miRNA mimic vengono veicolati, *in vivo*, attraverso nanoparticelle basate su polimeri e lipidi [129]; se queste particelle che li veicolano non danno effetti collaterali, questi potrebbero essere un promettente approccio terapeutico per il trattamento dei tumori (fig 19) [52,3].

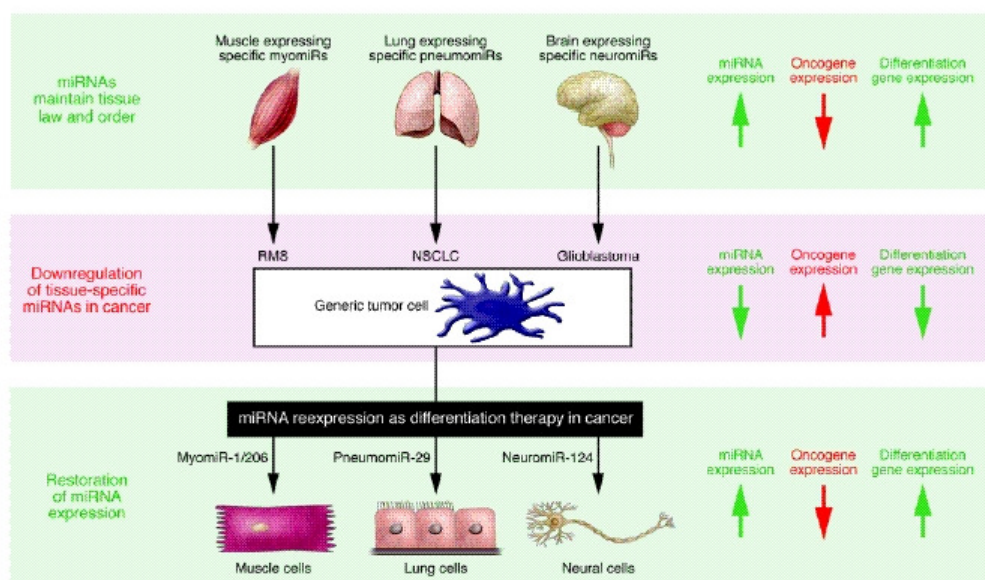


Figura19 miRNA come promettente approccio terapeutico per il trattamento dei tumori

1.11 MiR-146 e il suo ruolo clinico

Il *miR-146* umano esiste in due forme distinte: *miR-146a* localizzato sul cromosoma 5q33 (fig 20) e *miR-146b* localizzato sul cromosoma 10q24 (Fig 21). Poiché la loro forma matura di 22-mers differisce di soli 2 nucleotidi (Fig 22), molti geni target predetti sono comuni a entrambi; tuttavia, ogni singolo miR riconosce anche specifici target [130].

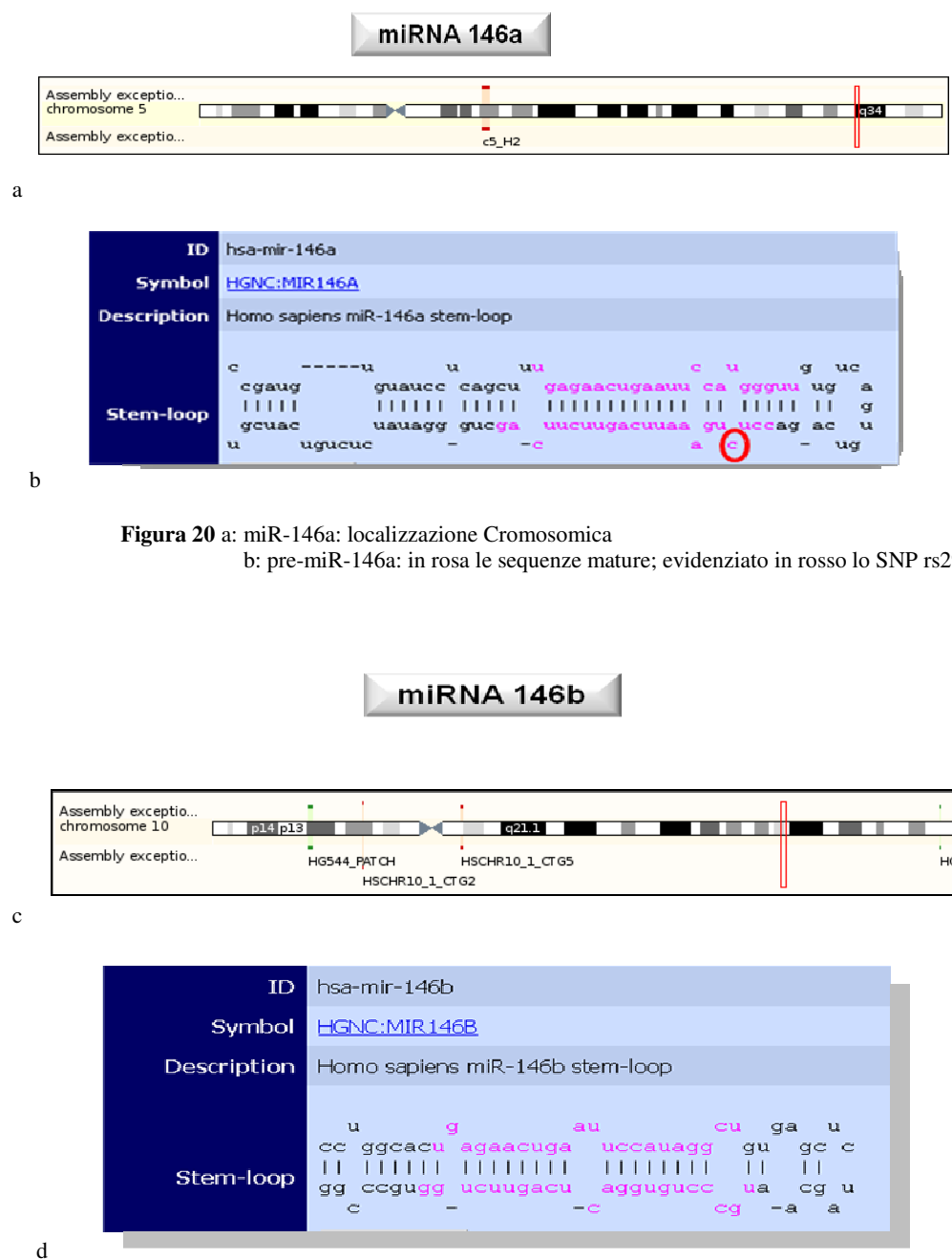


Figura 20 a: miR-146a: localizzazione Cromosomica

b: pre-miR-146a: in rosa le sequenze mature; evidenziato in rosso lo SNP rs2910164

Figura 21 c: miR-146b: localizzazione Cromosomica

d: pre-miR-146b: in rosa le sequenze mature

Mature sequence MIMAT0000449		Mature sequence MIMAT0002809	
Accession	MIMAT0000449	Accession	MIMAT0002809
ID	hsa-miR-146a	ID	hsa-miR-146b-5p
Sequence	21 - ugagaacugaauuccauggguu - 42	Sequence	9 - ugagaacugaauuccauagguu - 30

Figura. 22 Confronto fra la sequenza matura del miR-146a e miR-146b

I due *miR-146* sono differenzialmente regolati, infatti il *miR-146a*, a differenza del *miR-146b*, è fortemente indotto dai lipopolissaccaridi. E' stato inoltre proposto che il miR-146 abbia un ruolo nel Toll-like-receptor e nel signaling citochinico e quindi nella risposta immunitaria; inoltre ci sono evidenze che il *miR-146a* sia regolato da NF-kappa B [131].

In uno studio eseguito su 20 tessuti provenienti da pazienti, sottoposti ad intervento chirurgico, affetti da carcinoma papillare della tiroide (T-PTC) e corrispettivo tessuto sano (N-PTC) adiacente al tumore, sono stati trovati overespressi diversi microRNA, ma in particolare è stata osservata una forte overespressione (da 11 a 19 volte) di tre miRNA nel T-PTC rispetto al tessuto sano, tra cui il miR-146, il miR-221 e il miR-222. Secondo questo studio, per predire la presenza del T-PTC sono sufficienti l'analisi dell'espressione di 5 miRNA, miR-146, il miR-221, il miR-222, miR-21 e miR-181a [132]. Krystian Jazdewski et al (2008) hanno dimostrato, in un lavoro eseguito su 608 pazienti affetti da T-PTC, che un comune polimorfismo, rs2910164, nel *pre-miR-146a* ha effetti sulla quantità totale di miRNA maturo, (infatti l'espressione del pre-miR146a con l'allele C, quello più raro, era di 1.9 volte più bassa rispetto a quello con l'allele G; ma anche la quantità di miR-146a maturo era 1.8 volte più basso l'allele C vs quello con l'allele G) contribuendo alla predisposizione genetica ai T-PTC, giocando un ruolo nella tumorigenesi attraverso mutazioni somatiche [130].

Precedenti studi suggeriscono che questi effetti sono mediati attraverso i geni target, la cui espressione dipende dallo SNP; poichè il miR-146a è un gene NF-kappa B-dipendente [133,134], capace di inibire TRAF6 e IRAK1, molecole chiave a valle dei Toll-like receptor e dei recettori citochinici, Jazdewski K et al hanno ipotizzato un ruolo dello SNP del miR-146a nell'indurre un feedback negativo nel Toll-like receptor e nel signaling citochinico [130].

I pathway di NF-kappa B sono critici per la formazione del tumore poiché promuovono non solo la sopravvivenza cellulare attraverso l'espressione di proteine anti-apoptotiche, ma anche attraverso la trascrizione di geni immunocorrelati e citochine infiammatorie che possono influenzare la progressione tumorale attraverso la mobilitazione delle cellule ospiti [135].

In un successivo lavoro è stato determinato, sia in cellule transfettate U2OS sia nei tessuti di carcinomi papillari della tiroide (PTC), che il genotipo GC del miR-146a eterozigote produce 3 miRNA maturi: uno derivante dal filamento guida (miR-146a), e due derivanti dai filamenti passeggeri (miR-146a*G e miR-146a*C), ognuno in grado di riconoscere un diverso set di geni

target. Inoltre è stata osservata un'ampia differenza dei trascrittomi derivanti dai tumori con il genotipo GC e GG e nei tessuti sani derivanti da pazienti con PTC. Gli autori hanno ipotizzato che la produzione di distinti miRNA e la regolazione di differenti geni target tra l'eterozigote rispetto all'omozigote, può chiarire la predisposizione al PTC negli individui che sono eterozigoti [136].

Nei pazienti affetti da leucemia linfocitaria cronica (CLL) il miR-146 correla con il tempo di progressione della malattia [57]. In un altro studio è stato dimostrato che il miR-146, insieme con il miR-155 e il miR132, essendo geni responsivi alle endotossine, sono coinvolti anche nella risposta dell'immunità innata attraverso la regolazione della risposta infiammatoria acuta dopo il riconoscimento del patogeno ad opera dei Toll-like receptors (TLR) sui monociti o sui macrofagi [131,137]; infatti, il miR-146 è overespresso in risposta a componenti batteriche o a citochine pro-infiammatorie, come IL-1 e TNF [131,137]. Sia il miR-146 che il miR-155 causano un feedback negativo, attenuando il signaling dei TLR, per cui il miR-146 limita l'espressione di IRAK1 e TRAF6 [131].

Studiando il ruolo di alcuni miRNA nella patogenesi delle malattie infiammatorie, è stato evidenziato che il miR-146 e il miR-155 possono essere indotti da stimoli pro-infiammatori come l'interleuchina 1, il tumor necrosis factor alpha (TNF α) e i Toll-like receptors (TLR); entrambi i miRNA hanno diversi target, ad esempio il miR-146 inibisce il signaling dei TLR, il miR-155 regola le cellule Th1 e mRNA per il TNF α [138]. Nell'artrite reumatoide (RA) dei tessuti sinoviali l'espressione del miR-146 è indotta dalla stimolazione con TNF α e interleuchina 1 beta (IL-1B) [139]. In un recente studio è stato dimostrato che l'overespressione dei miR-9, miR-98 o miR-146 isolati nei condrociti umani riduce i livelli di IL-1 B inducendo la produzione di TNF- α ; questo suggerisce che questi miRNA mediano le funzioni infiammatorie e i loro pathways [140]. Le citochine infiammatorie giocano un ruolo chiave nella degenerazione osteoarticolare (OA); tra le citochine cataboliche più importanti, con un ruolo cruciale nell' OA c'è IL-1B. Questa citochina non solo promuove il rilascio di enzimi degenerativi come le MMP e le aggrecanasi, ma inibisce anche la sintesi delle proteine della matrice extracellulare attraverso i condrociti [141]. La cartilagine OA è stata suddivisa in tre gradi, ed è stata evidenziata un'intensa espressione del miR-146 nella cartilagine OA di basso grado; è stato confermato che il miR-146 è espresso successivamente alla stimolazione di IL-1B nei condrociti isolati dalla cartilagine normale. Questo supporta l'ipotesi che l'espressione del miR-146a è indotta nella patogenesi OA [142].

Il miR-146 sembra avere un ruolo anche nel lupus eritematoso sistemico (SLE), regolando i livelli di espressione di TRAF6, IRAK1, STAT-1 e IFN regulatory factor 5 (IRF-5), tutti fattori importanti per i pathway dell'IFN. La riduzione del miR-146 nelle cellule mononucleate di

sangue periferico, da pazienti con SLE, contribuisce, probabilmente, ad alterare i livelli di questi fattori inducendo l'overespressione dell'IFN di tipo I, causando così la malattia [143].

Nelle cellule provenienti da leucemia a cellule T (ATL) è stata dimostrata una downregolazione dei miR-146b e miR-125a [144]; perciò, la diminuzione nelle cellule ATL del miR-146b e miR-125a potrebbe causare un incremento dell'infiammazione e ad una diminuzione della funzionalità dei T-reg, caratteristiche osservate nei pazienti affetti da virus della leucemia a cellule T di tipo 1 nell'uomo (HTLV-1) [145].

Nelle arterie carotidee di topi, sottoposti ad angioplastica, il miR-21, -146, -214 e -352 sono stati rilevati overespressi [146]. Il knockdown del miR-21 riduce la formazione delle lesioni alla neointima riducendo la proliferazione e promuovendo l'apoptosi delle cellule del muscolo liscio vascolare [147]; quindi la loro upregolazione di questi miRNA può giocare un ruolo importante nella patogenesi di questa malattia [146].

In uno studio, è stato trovato che il polimorfismo genetico nel gene miR-146a (rs2910164) è associato con una diagnosi familiare di tumori della mammella/ovaio in età giovanile. Gli autori hanno ipotizzato che il collegamento tra questo SNP e la diagnosi del tumore alla mammella/ovaio in giovane età può accadere attraverso la regolazione dell'espressione dell'mRNA di BRCA1/2 [148]. Dal loro studio è stato osservato che queste varianti a carico del pre-miR-146a causano un incremento nella produzione del miR-146a maturo [148]. Attraverso saggi *in vitro* è stato osservato che il miR-146a può direttamente legarsi al 3'UTR di BRCA1/2 e quindi regolare l'espressione dell'mRNA di BRCA1/2. In particolare è stato dimostrato che la capacità del miR-146a di legarsi al 3'UTR di BRCA1 è più forte per la variante con l'allele C rispetto a quelle dell'allele G; inoltre, la capacità di legame del miR-146a è più forte per BRCA1 rispetto a BRCA2, indipendentemente dall'allele comune o dalla variante [148].

Il Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1), proteina nucleare capace di regolare differenzialmente l'espressione di geni multipli e di guidare la soppressione di metastasi, sembra upregolare in modo significativo il miR-146a da 6 a 60 volte nelle cellule metastatiche MDA-MB-231 e MDA-MB-435, e il miR-146b di 40 volte nelle MDA-MB-435. La trasduzione del miR-146a e miR-146b nelle MDA-MB-231 downregola l'espressione dell'epidermal growth factor receptor (EGFR), inibendo l'invasività e la migrazione *in vitro*, e sopprimendo sperimentalmente le metastasi polmonari dal 69% al 84% [149,150].

Il miR-146a sembra coinvolto nella carcinogenesi [132] e nella regolazione della risposta immunitaria [131], controllando la differenziazione di Mk attraverso il targeting di CXCR4 [151]. Gli autori hanno anche dimostrato che miR-146a interagisce direttamente con due regioni "seed" nel 3'UTR dell'mRNA di CXCR4, inibendo la sua traduzione; quindi l'inibizione di CXCR4 blocca la normale megacariopoiesi e la trombopoiesi, dimostrando che CXCR4 ha un ruolo importante in questo processo [151].

Recentemente è stato chiarito per la prima volta il coinvolgimento del miR-146a (e probabilmente del miR-146b) nella progressione del tumore alla prostata [152]. La protein kinasi attivata da Rho (ROCK1), uno dei predetti geni target riconosciuti dal miR-146a, è coinvolta nella trasformazione e nella metastatizzazione *in vivo* del tumore alla prostata ormone-refrattario (HRPC) mediata dall'acido ialuronico (HA) [153]. Così in presenza di una grande quantità di acido ialuronico, il silenziamento di ROCK1 mediato dal miR-146a può giocare un ruolo importante nella soppressione della tumorigenicità mediate da HRPC, così come nella proliferazione cellulare (antiapoptosi), nell'invasione e nella metastatizzazione [152]. Quindi i pathway del signaling di ROCK1 stimolati da HA, sono responsabili di più del 70% delle trasformazioni di HRPC *in vivo* e nelle cellule PC3 androgene-indipendente, causando una elevata proliferazione cellulare del tumore androgeno indipendente, invasione e metastasi. La perdita del miR-146 avviene nelle linee cellulari PC3 e LNCaP C4-2B in modo androgeno indipendente, come accade in più del 75% di carcinomi prostatici avanzati e metastatici *in vivo*. Transfettando il miR-146a nelle cellule PC3 si restaura il silenziamento genico di ROCK1 mediato dal miR-146a, causando una diminuzione della tumorigenicità HA/ROCK-dipendente, in termini di marcata riduzione della proliferazione cellulare tumorale, invasione e adesione [152].

1.12 MiR-149 e il suo ruolo clinico

Il *miR-149* umano è localizzato sul cromosoma 2q37.3, attualmente è conosciuta solo una forma (fig 23).

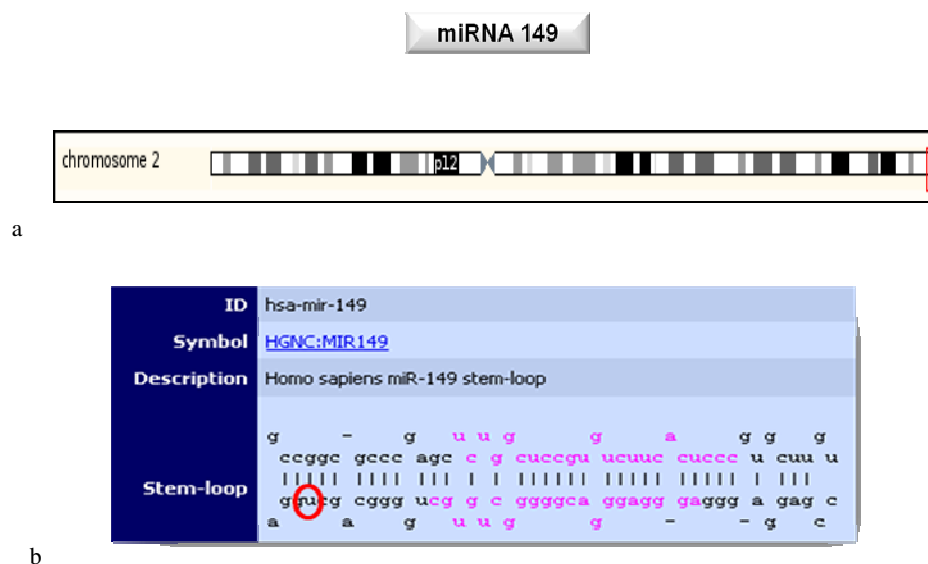


Figura 23a: miR-149: localizzazione Cromosomica

b: pre-miR-149; in rosa le sequenze mature evidenziato in rosso lo SNP rs2292832

In un lavoro sono stati rilevati alti livelli di 4 miRNA placentali nel plasma materno, tra questi il miR-141, miR-149, miR-299-5p, e il miR-135b, rispetto ai livelli post-parto; concludendo che questi miRNA sono associati alla gravidanza [154]. Alcuni miRNA possono contribuire a far interagire il patogeno con la cellula ospite durante l'infezione da HIV-1; risulta infatti che il miR-29a e miR-29b hanno come target il gene *nef*, miR-149 ha come target il gene *vpr*, il miR-378 ha come target *env*, e miR-324-5p ha come target il gene *vif*. Gli autori hanno verificato che questi 5 miRNA sono espressi nelle cellule-T, normale sito di infezione dell'HIV-1; in particolare è stato visto che alcuni miRNA possono avere un target cruciale per HIV-1, come il gene *nef*, che ha un ruolo importante nel ritardare la progressione della malattia [155]. Valutando l'espressione di un pattern di microRNA nei carcinoma a cellule squamose (SCC) della lingua, è stato osservato che il miR-149 è downregolato, ma soprattutto che l'overespressione del miR-184 può avere un ruolo oncogenico nei processi di proliferazione e antiapoptotici nel SCC della lingua; la rilevazione plasmatica del miR-184 è associato con la presenza del tumore primario [156].

Nei carcinomi a cellule renali a cellule chiare (ccRCC) rispetto al tessuto normale è stato analizzato l'espressione di 35 microRNA, e di questi, 26 erano downregolati, tra cui il miR-149,

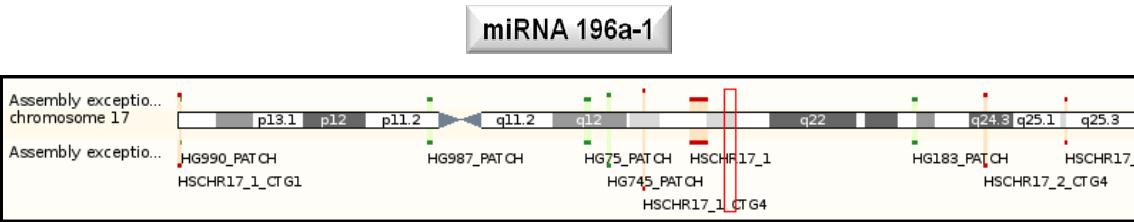
e 9 erano up-regolati. Gli autori hanno rilevato nuovi possibili marcatori per il ccRCC, ed hanno mostrato che bassi livelli di espressione del miR-149 causano un'acquisizione della funzionalità di due oncogeni, KCNMA1 e LOX [157].

In un altro studio, è stato dimostrato che le alterate espressioni di alcuni miRNA, tra cui il miR-149*, sembrano essere coinvolte nell'ingresso del virus dell'epatite C (HCV), nella replicazione e nella propagazione [158].

Nei granulociti di pazienti affetti da mielofibrosi primaria (PMF), sono stati riscontrati alcuni miRNA, tra questi il miR-149 e il miR-150 sono downregolati rispetto ai granulociti di controllo. Analizzando 3 possibili geni target per il miR-149 e il miR-150, in particolare è stato evidenziato che HMGA2, fattore trascrizionale appartenente al gruppo di proteine ad alta mobilità, è overespresso in 2 pazienti con la traslocazione t(4;12) e t(5;12) [159] e nei pazienti affetti da mielofibrosi primaria, anche in assenza di anomalie a livello del cromosoma 12 [160]. I risultati ottenuti dagli autori hanno rilevato che HMGA2 è uno dei geni più differenzialmente espressi tra PMF e le policitemie vere (PV), o le trombocitemie essenziali (ET); quindi l'alterata espressione di questo gene target nei granulociti PMF, correla con i livelli di espressione dei miRNA regolatori [161].

1.13 MiR-196 e il suo ruolo clinico

Il *miR-196* umano è caratterizzato da due forme distinte: il miR-196a e il miR-196b. Il miR-196a ha due sottoclassi: miR-196a-1 è localizzato sul cromosoma 17q21.32 (fig 24) mentre il miR-196a-2 è localizzato nel cromosoma 12q13.13 (fig 25), entrambi hanno la stessa sequenza del miRNA maturo, ma diversa localizzazione cromosomica (Fig.27). Il miR-196b è invece localizzato sul cromosoma 7p15.2 (fig 26a e b) e differisce dai miR-196a per 1 nucleotide (Fig 27c).

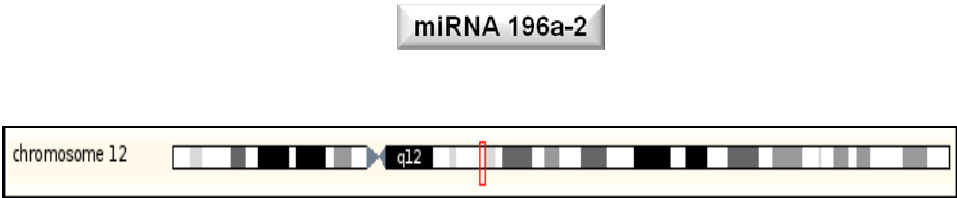


a

ID	hsa-mir-196a-1
Symbol	HGNC:MIR196A1
Description	Homo sapiens miR-196a-1 stem-loop
Stem-loop	ua a c - gc ugg gugaau ggu guuu auguuguug g c g u cacuua cca caaa uacaacaac c g u gc c u a aa ucu

b

Figura 24a: miR-196a-1: localizzazione Cromosomica
b: pre-miR-196a-1: in rosa le sequenze mature



c

ID	hsa-mir-196a-2
Symbol	HGNC:MIR196A2
Description	Homo sapiens miR-196a-2 stem-loop
Stem-loop	-ug - -uc --c a a ug cucg c agcugau uguggcuuagguuaguuuc ugnuguuggg u ag u gagc g uuggcug acauugagucucuaaag acaacggcuc a uu cgg u cuu acu a a gu

d

Figura 25c: miR-196a-2: localizzazione Cromosomica
d: pre-miR-196a-2: in rosa le sequenze mature evidenziato in rosso lo SNP rs11614913

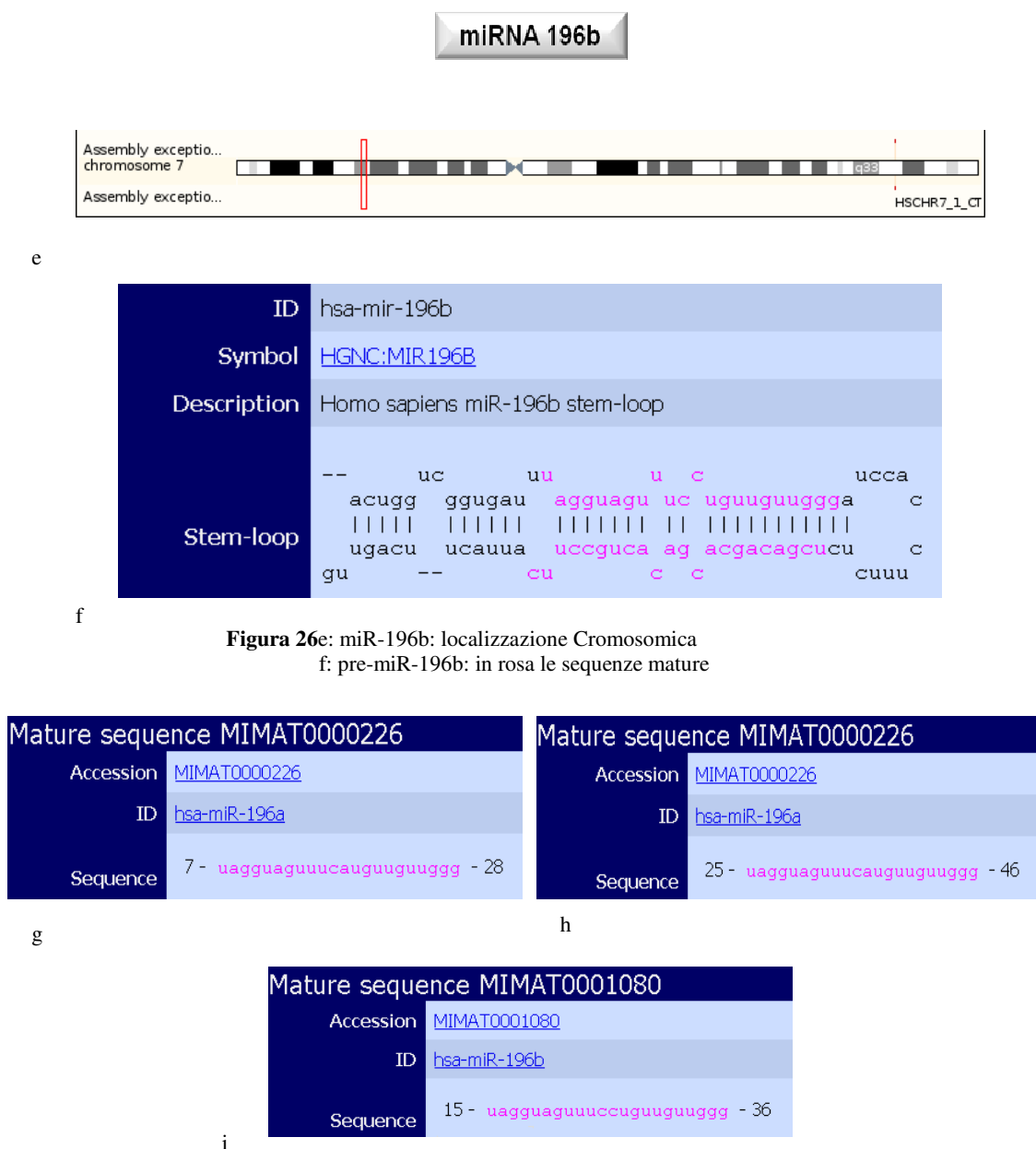


Figura 27 Confronto fra le sequenze mature della famiglia dei miR-196: g) e h) Medesima sequenza tra il miR-196a-1 e miR-196a-2; i) sequenza del miR-196b

I clusters dell'homeobox (HOX) sono gruppi di fattori trascrizionali genici cruciali per numerosi processi di sviluppo [162]; nei mammiferi esistono 4 clusters HOX (HOX A, B, C, D) [162]. Da diversi lavori risulta evidente che i geni per il miR-196 mappano sui clusters dell'homeobox (HOX) [163,164], in particolare, l'accoppiamento tra il miR-196a e il 3'UTR di HOXB8 è perfetto; l'importanza di questa complementarità è supportata dall'alta conservazione di questo sito fra specie diverse. Dagli esperimenti eseguiti su embrioni di topo è stato dimostrato che l'mRNA di HOXB8 è il target del clivaggio da parte del miR-196a [165].

Il miR-196 inibisce l'espressione di HOXB8 aumentando la differenziazione mieloide nelle cellule HL60. I loro risultati suggeriscono che l'espressione esogena del miR-196 reprime l'espressione di HOXB8 clivando il suo mRNA [166].

In uno studio sono stati introdotti diversi miRNA, tra cui il miR-196a1, il miR-196a2 e il miR-196b all'interno delle cellule tumorali metastatiche della mammella MDA-MB-231 tramite lentivirus. Andando a valutare gli effetti sulla migrazione cellulare, step critico della metastatizzazione, è stato osservato che la forzata espressione del miR-196a1/2 o del miR-196b blocca *in vitro* l'invasione tumorale e *in vivo* la spontanea metastatizzazione delle cellule tumorali della mammella, dimostrando che i membri della famiglia del miR-196 sono potenti soppressori delle metastasi, oltre ad inibire l'espressione del fattore di trascrizione HOXC8. Gli autori hanno rilevato che il rapporto del miR-196 con mRNA HOXC8 può essere un indicatore delle capacità del tumore della mammella a metastatizzare [167].

Dal punto di vista dei miRNA e il loro ruolo nella regolazione della risposta immunitaria, è stato dimostrato che alcuni miRNA della cellula ospite possono giocare un ruolo nella difesa antivirale: infatti l'interferone beta (IFN-B) e le citochine antivirali, sono indotti da numerosi miRNA cellulari, come il miR-196, miR-296, miR-351, miR-431, miR-448, le cui sequenze target si trovano all'interno del RNA genomico dell' HCV [168]. L'overespressione di questi miRNA nelle cellule di fegato infettate, sostanzialmente attenua la replicazione virale dimostrando l'importanza dei miRNA nell'immunità anti-virale [168,169].

E' noto che le traslocazioni cromosomiche, coinvolgendo il gene della Mixed Lineage Leukemia (MLL), producono proteine chimeriche che causano alterazioni dell'espressione di un certo numero di geni HOX e causano lo sviluppo della leucemia [170,171]. MLL normalmente regola l'espressione del miR-196b, un miRNA ematopoietico localizzato all'interno del cluster di HoxA (tra i geni HOXA9 e HOXA10), durante la differenziazione delle cellule staminali embrionali (ES) [172]. All'interno della linea ematopoietica, il miR-196b è molto abbondante nelle cellule staminali ematopoietiche a breve termine, mentre è downregolato nelle cellule ematopoietiche più differenziate; è stato anche dimostrato che la funzione del miR-196b è necessaria per l'immortalizzazione fusione mediata di MLL [172]. Gli autori hanno osservato una overespressione del miR-196b in pazienti affetti da leucemia associata a MLL; l'overespressione del miR-196b nelle cellule progenitrici del midollo osseo causa un incremento delle loro capacità proliferative e di sopravvivenza, così come un parziale blocco della differenziazione. Quindi incrementando l'espressione del miR-196b attraverso le proteine di fusione MLL si promuove lo sviluppo della leucemia [172]. Infatti secondo un altro studio il miR-196a regola determinati oncogeni durante la leucemogenesi [173].

Diversi lavori identificano il miR-196a come potenziale biomarker associato a diversi tipi di tumori; infatti il miR-196a risulta essere alterato nel tumore della mammella[174], e può essere

correlato con la sopravvivenza di pazienti affetti da adenocarcinoma pancreatico [175]. Alterazioni genetiche di questo miRNA possono influenzare la quantità e la funzione del miR-196a maturo; la variante T>C dello (SNP rs11614913) del miR-196a è associata con la sopravvivenza nei pazienti affetti da tumore del polmone [176,177] e incrementa il rischio di tumore alla mammella [178].

Il polimorfismo rs11614913 a carico del miR-196a2 è associato con una suscettibilità alle caratteristiche clinicopatologiche in pazienti cinesi affetti da carcinoma epatocellulare (HCC) correlato al virus dell'epatite B (HPV) [179]. Infatti il rischio di HCC è stato trovato significativamente più alto in pazienti con il genotipo CC rispetto a quelli con il genotipo TT. Inoltre è stato osservato che l'allele T è più frequente nei pazienti HCC maschi con metastasi linfatiche [179].

Diversamente dagli studi visti precedentemente sul tumore del polmone e sul tumore della mammella, il genotipo CC dello SNP rs11614913 a carico del miR-196a è associato con una diminuzione del rischio di glioma nella popolazione cinese; questa differenza può dipendere dalla diversità del tessuto di origine, dal tipo di tumore, dalla tumorigenesi e dal processo di sviluppo [180].

1.14 MiR-499 e il suo ruolo clinico

Il *miR-499* umano è localizzato sul cromosoma 20q11.22, ed attualmente siamo a conoscenza di una sola forma (fig 28).

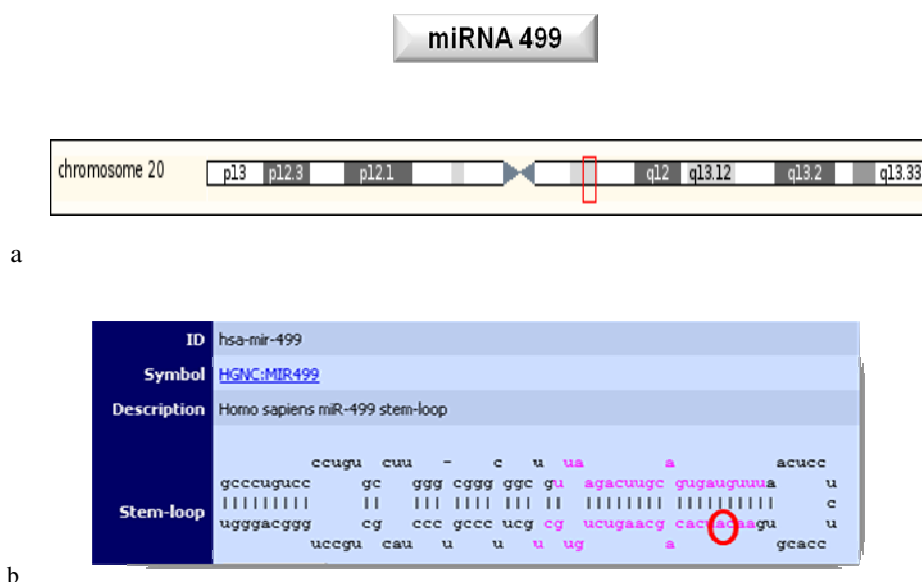


Figura 28 a: miR-499: localizzazione Cromosomica

b: pre-miR-499: in rosa le sequenze mature evidenziato in rosso lo SNP rs376444

Nelle cellule staminali mesenchimali umane (hMSCs) senescenti è stata osservata una upregolazione dell'espressione del miR-499 rispetto alle hMSC nei passaggi iniziali, dimostrando che questo miRNA può avere degli effetti sulla senescenza replicativa, facendo perdere alle cellule la capacità di dividersi [181].

Il miR-499 sembra avere un ruolo importante nell'ambito vascolare, infatti dopo aver isolato le cellule progenitrici di cardiomiociti (CMPC) fetali umani, e averli messi in coltura e differenziati in cardiomiociti, il profilo di espressione dei miRNA ha mostrato una upregolazione del miR-1 e miR-499 nelle cellule differenziate. La trasfezione transiente del miR-1 e -499 nelle CMPC riduce l'indice di proliferazione dal 25% al 15% e aumenta la differenziazione in cardiomiociti umani. Quindi i miR-1 e -499 regolano la proliferazione delle CMPC e la loro differenziazione in cardiomiociti; modulando i livelli di espressione di questi 2 miRNA, la funzione delle CMPC umane possono essere alterate e differenziate [182].

Nel plasma di 14 pazienti affetti da sindrome coronaria acuta, 15 con insufficienza cardiaca congestizia e 10 senza malattie cardiovascolari i livelli di espressione del miR-499 sono stati rilevabili in tutti gli individui con infarto miocardico acuto, ma sono sotto i limiti di rilevazione

per tutti gli altri gruppi di pazienti; quindi il miR-499 può essere un biomarker per rilevare gli infarti miocardici acuti anche direttamente dal plasma, poiché il miR-499 è espresso quasi esclusivamente nel tessuto cardiaco [183].

Sono stati analizzati i livelli di espressione di diversi miRNA nel siero di pazienti affetti da NSCLC con una lunga e breve sopravvivenza; infatti sembra che i livelli di 11 miRNA nei pazienti con una lunga sopravvivenza erano di 5 volte maggiori rispetto a quelli con bassa sopravvivenza, e in particolare i livelli di 4 miRNA, il miR-486, il miR-30d, il miR-1 e il miR-499; quindi questi 4 miRNA rilevati nel siero possono servire come fattori predittivi, non invasivi, associati alla sopravvivenza per i NSCLC [184].

1.15 MiR-146a, miR-149, miR-196a2 e miR499

Diversi studi, hanno valutato come SNP o mutazioni possono alterare l'espressione o la maturazione di un miRNA. Molti lavori, su diversi tipi di malattie, ma soprattutto sul cancro hanno valutato queste varianti genetiche a carico dei geni codificanti per 4 microRNA: il miR-146a (rs2910164), il miR-149 (rs2292832), il miR-196a2 (rs11614913) e il miR-499 (rs376444) per verificare l'eventuale correlazione con il rischio, con la diagnosi, con la stadiazioni, con la prognosi e con la sopravvivenza.

In uno di questi lavori gli autori hanno analizzato le varianti e la loro corrispettiva espressione dei miR-146a, -149, -196a2 e -499 in una popolazione cinese affetta da malattia congenita del cuore (CHD). Ciò che risulta evidente da questo studio è che lo SNP del miR-196a2, rs11614913, con il genotipo CC è associato con un significativo incremento del rischio di CHD. Correlando il genotipo dello SNP del miR-196a2, rs11614913 con il fenotipo nei campioni di tessuti cardiaci di CHD, è stato osservato che il genotipo CC è associato con un significativo incremento dell'espressione del miR-196a2 maturo; questo dimostra come la variante rs11614913 a carico del miR-196a2 gioca un ruolo nella suscettibilità al CHD. Esperimenti *in vitro* hanno rilevato che questo SNP ha degli effetti sul legame tra HOXB8 e il miR-196° [185]. Recentemente Shen et al 2008, hanno riportato che gli SNP rs11614913 nel miR-196a2 e rs376444 nel miR-499 sono stati associati con un incremento del rischio di tumore della mammella, mentre lo SNP rs2910164 nel miR-146a è stato correlato con l'età di insorgenza del tumore alla mammella [148]. Catucci et al 2010, hanno valutato gli SNP nei miR-146a, 196a2 e -499 in pazienti tedeschi e italiani affetti da cancro della mammella familiare, confrontati con pazienti di controllo italiani e tedeschi; ma, diversamente da quanto hanno riportato Shen et al, i loro dati non confermano l'associazione tra questi 3 SNP e il rischio di sviluppo del tumore alla mammella, o con l'età di insorgenza del tumore [186].

In un altro studio sul tumore delle mammella, sono state valutate le quattro varianti viste precedentemente a carico dei pre-miR-146a, -149, -196a2 e -499 in una popolazione cinese. Secondo i loro risultati, le varianti del miR-196a2 rs11614913: T>C e del miR-499 rs376444: A>G sono state associate con un significativo incremento del rischio di tumore della mammella [177].

Il più recente studio effettuato su questi 4 SNP a carico dei pre-miR-146a, -149, -196a2 e -499, è stato eseguito in una popolazione cinese affetta da tumore del polmone. Da questo studio gli autori hanno dimostrato che la variante CC del miR-196a2 rs11614913 è associata con il 25% in più rischio di sviluppare un tumore al polmone rispetto al genotipo wild-type omozigote TT e all'eterozigote TC, mentre gli altri SNP dei miR-146a, miR-149 e miR-499 non hanno mostrato un effetto significativo sul rischio di insorgenza del tumore. Questi risultati suggeriscono che lo

SNP del miR-196a2 può contribuire alla predisposizione al tumore al polmone [178]. Lo SNP a carico del miR-196a2 rs11614913 è associato con una ridotta sopravvivenza nel NSCLC, causato dall'alterazione dell'espressione del miR-196a maturo e dall'alterazione del legame con mRNA target [176], mentre lo SNP a carico del miR-146a rs2910164 riduce l'espressione del miR146a ed ha effetti anche sul legame del target [92].

MICRORNA NEL NSCLC

2. IL TUMORE DEL POLMONE

2.1 Epidemiologia del Tumore del Polmone

I polmoni sono due organi simmetrici, spugnosi, posti nel torace, la loro funzione è quella di trasferire l'ossigeno respirato al circolo sanguigno e depurarlo dall'anidride carbonica prodotta dall'organismo.

Il tumore del polmone compromette questa funzione provocando una crescita incontrollata di determinate cellule polmonari (quelle che costituiscono bronchi, bronchioli e alveoli) che possono costituire una massa che ostruisce il corretto flusso dell'aria, oppure provocare emorragie polmonari o bronchiali.

Il tumore del polmone è una delle neoplasie maligne più diffuse a livello mondiale (il 12% di tutti i tumori) e rappresenta la prima causa di morte nei Paesi industrializzati [187]. Nel 2009 negli Stati Uniti sono stati stimati 220000 nuovi casi di tumore del polmone e 159000 decessi a causa di questo tipo di malattia; sembra che solo il 15% dei pazienti che sviluppano tumore al polmone sopravvive a 5 anni [188,189].

Questa malattia da sola rappresenta il 20% di tutti i tumori maligni nelle persone di sesso maschile; tuttavia in questi ultimi anni si sta registrando un progressivo aumento anche tra le donne, e questo è dovuto al fatto che le donne fumano sempre di più [190,191].

2.2 Eziologia del NSCLC

Il fumo prodotto dalla combustione di tabacco è la prima causa di cancro al polmone. Il rischio di sviluppare un tumore aumenta in relazione: al numero di sigarette fumate (maggiore è il numero, più sale il rischio); all'età in cui si inizia a fumare (più si è giovani, più rischi si corrono); all'assenza di filtro nelle sigarette (i prodotti della combustione, come i catrami, contribuiscono in modo rilevante alla patologia) [190,192]. Nei soggetti che smettono di fumare il rischio si riduce nel corso dei 10-15 anni successivi, fino a eguagliare quello di chi non ha mai fumato. Anche il fumo passivo aumenta il rischio di sviluppare il carcinoma polmonare [193].

Il fumo di sigaretta contiene numerose sostanze che agiscono direttamente (cioè con lesioni immediate) o indirettamente (cioè con lente modificazioni nel corso del tempo) a livello dei bronchi. Per fare un esempio, sono cancerogeni diretti gli idrocarburi aromatici policiclici (cioè i prodotti della combustione, tra cui il ben noto benzopirene) e le nitrosamine (derivati dell'ammoniaca usati nella lavorazione delle sigarette); invece i fenoli e le aldeidi (contenuti per esempio nella carta) si sono dimostrati fattori indiretti, cioè sono in grado, col tempo, di promuovere la trasformazione delle cellule in senso tumorale [194].

Esistono poi altri cancerogeni chimici come l'amianto (asbesto), il radon, i metalli pesanti, il catrame e gli oli minerali, che provocano il tumore del polmone soprattutto in quella parte di popolazione che viene a contatto con queste sostanze per motivi di lavoro: si parla in questo caso di esposizione professionale [194].

Infine non bisogna dimenticare alcune alterazioni genetiche coinvolte in questa malattia: le più importanti sono quelle che avvengono a carico del gene *p53*, *KRAS*, *FHIT*, *ERB*, *MYC* e *BCL2* [193].

Si ritiene che il tumore al polmone abbia origine da una cellula staminale pluripotente capace di esprimere diversi fenotipi. Nella normale istogenesi questa cellula staminale epiteliale è in grado di differenziare nei tipi cellulari che costituiscono l'albero tracheobronchiale come le cellule pseudostratificate, ciliate caliciformi colonnari, cellule neuroendocrine e i pneumociti di tipo I e II che rivestono gli alveoli; le cellule che sono capaci di dividersi possono mostrare cambiamenti iperplastici, metaplastici o neoplastici [195].

2.3 Tipologie del Tumore del Polmone

Secondo la classificazione della World Health Organization (WHO), esistono due forme di cancro al polmone: il cancro al polmone non a piccole cellule (NSCLC) che comprende circa l'80% di tutti i carcinomi polmonari, mentre il restante 18% è rappresentato da cancro del polmone a piccole cellule (SCLC) [196,189].

Tra i NSCLC sono compresi:

- Carcinoma a cellule squamose
- Adenocarcinomi
- Carcinomi a cellule grandi

Il carcinoma a cellule squamose ha una frequenza del 30% tra tutti i tumori al polmone nel Nord America. Nella maggior parte dei casi il carcinoma a cellule squamose origina nella porzione segmentale prossimale dei bronchi ed è associata a metaplasia squamosa. Nelle forme precoci, come nel carcinoma in situ, la stratificazione dell'epitelio squamoso viene sostituito da cellule squamose maligne senza invadere la membrana basale.

Grazie all'attitudine di queste cellule di esfoliare, il carcinoma a cellule squamose può essere rilevato attraverso la citologia anche in uno stadio precoce; è un tipo di tumore a crescita lenta e sembra siano richiesti dai 3 ai 4 anni dallo sviluppo del carcinoma in situ a tumore clinicamente visibile (Fig.29 e Tab.5) [196].

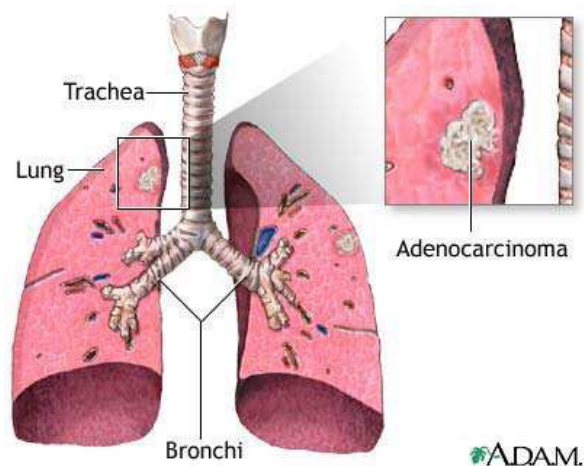


Figura 29 Rappresentazione schematica di un carcinoma a cellule squamose con coinvolgimento dei bronchi principali.

Nel Nord America, l'adenocarcinoma è il tumore più frequente e corrisponde al 40% di tutti i casi di tumore del polmone; la maggior parte di questi tumori hanno un'origine periferica, derivanti dalla superficie alveolare dell'epitelio o dalle ghiandole mucosali bronchiali (Fig.30) [196].

Istologicamente, questi tumori formano ghiandole e producono mucina; sebbene possono essere suddivisi microscopicamente

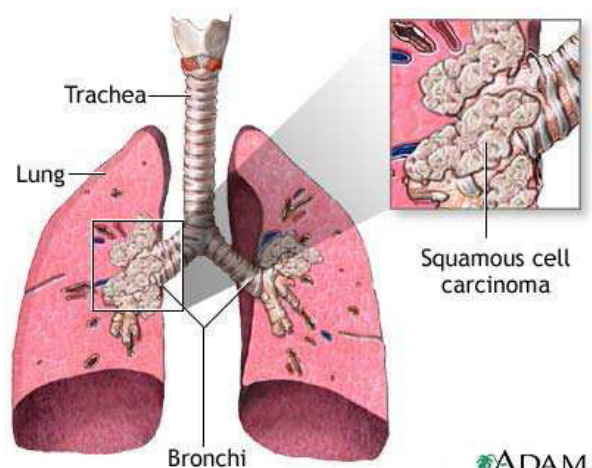


Figura 30 Rappresentazione schematica di un adenocarcinoma con coinvolgimento degli alveoli.

in 4 tipi in base alla classificazione WHO, sembra che il carcinoma bronco alveolare sia una distinta entità clinico-patologica, derivante dai pneumociti di tipo II. Questi tumori si presentano in 3 modi diversi: noduli periferici solitari, malattia multifocale, o una forma pneumonica a progressione rapida [196]. Il carcinoma a cellule grandi, è il meno comune tra tutti i tumori NSCLC, si ritrova nel 15% di tutti i tumori al polmone. Secondo la classificazione WHO, questo gruppo viene ulteriormente suddiviso in cellule giganti e cellule chiare. Questi tumori appaiono essere scarsamente differenziati e sembrano avere una prognosi peggiore (Tab.5) [196].

I tumori del polmone a piccole cellule (SCLC) hanno un sito di origine intramucosale spesso difficile da identificare. Si pensa che derivino dalle cellule di Kulchitsky o da cellule neuroendocrine basali. Queste cellule secernenti ormoni peptidici sono rare nell'adulto ma abbondanti nel polmone fetale. I tumori a piccole cellule infiltrano la sottomucosa negli stadi precoci della malattia, mentre, la metaplasia squamosa o la displasia è presente nella mucosa bronchiale sovrastante (Fig.31).

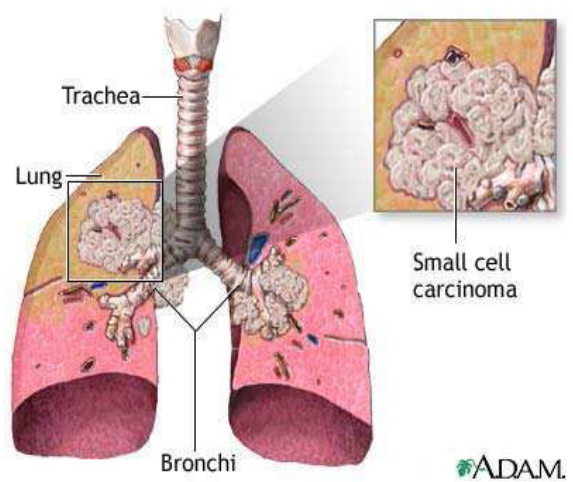


Figura 31 Rappresentazione schematica del cancro del polmone a piccole cellule con coinvolgimento dei bronchioli.

Secondo la classificazione dell'organizzazione mondiale della sanità, SCLC si può suddividere in 3 sottogruppi:

- le cellule a chiacco d'avena,
- gli intermedi
- i combinati (SCLC combinati con il carcinoma squamoso o l'adenocarcinoma) [197].

Le distinzioni istologiche tra tumori a piccole cellule e tumori non a piccole cellule è di grande importanza clinica. I sottotipi intermedi del tumore a piccole cellule spesso possono essere confusi sia con il carcinoma squamoso, sia con il tumore a cellule grandi, sia con gli adenocarcinomi, a causa della scarsa differenziazione soprattutto nei siti metastatici. Nonostante la loro localizzazione sottomucosale, i tumori a piccole cellule spesso hanno cellule maligne esfoliate nei lavaggi citologici (Tab.5) [197].

Carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC):
1. Carcinoma a cellule squamose (epidermoide)
2. Carcinoma a grandi cellule
• A cellule giganti • A cellule chiare
3. Adenocarcinoma
• Acinoso • Papillare • Bronchioalveolare • Mucosecemente
Carcinoma polmonare a piccole cellule o microcitoma (SCLC):
• A chicco d'avena • A cellule intermedie • Combinato

Tabella 5 Classificazione WHO del cancro del polmone.

2.4 Diagnosi e Stadiazione del Tumore al Polmone

La stadiazione del tumore al polmone avviene in accordo al sistema di stadiazione internazionale TNM, approvato dall'American Joint Committee on Cancer (AJCC), Union Internationale Contre Cancer (UICC). Il tumore primario è suddiviso in 4 categorie dipendenti dalle dimensioni, dal sito e dal coinvolgimento locale (T1-4).

La diffusione linfonodale è stata suddivisa in broncopolmonare (N1), mediastino ipsilaterale (N2), malattia controlaterale o sopraclavicolare (N3), e diffusione metastatica assente o presente (M0 o M1) (Tab.6) [196].

Tumore primitivo (T)	
TX	Presenza di cellule maligne nell'escreato o nel liquido di lavaggio bronchioalveolare; tumore non evidenziato dalla radiografia del torace o dalla broncoscopia.
T0	Nessuna evidenza di tumore primitivo.
Tis	Carcinoma in situ.
T1	Tumore < 3 cm circondato da parenchima polmonare o da pleura viscerale, senza segni di invasione del bronco lobare prossimale alla broncoscopia.
T2	Tumore > 3 cm, interessamento del bronco principale almeno 2 cm distalmente alla carena tracheale, invasione della pleura viscerale o associato ad atelectasia o polmonite ostruttiva che si estende alla regione ilare, ma non interessa il polmone in toto.
T3	Tumore di qualsiasi dimensione con invasione della parete toracica (inclusi i tumori del sulcus superiore), del diaframma, del mediastino, della pleura parietale o tumore del bronco principale a meno di 2 cm distalmente alla carena, ma senza interessamento della carena stessa o associato ad atelectasia o polmonite ostruttiva dell'intero polmone.
T4	Tumore di qualsiasi dimensione con invasione di organi mediastinici: cuore, grossi vasi, esofago, trachea, corpi vertebrali, carena o presenza di versamento pleurico citologicamente positivo.
Linfonodi regionali (N)	
NX	I linfonodi regionali non possono essere definiti.
N0	Assenza di interessamento dei linfonodi regionali.
N1	Interessamento dei linfonodi peribronchiali e/o ilari omolaterali, compresa l'estensione diretta del tumore primitivo.
N2	Interessamento dei linfonodi mediastinici e/o ilari omolaterali e/o sottocarenali.
N3	Interessamento dei linfonodi mediastinici e/o ilari controlaterali e/o linfonodi scalenici o sovraclaveari omolaterali e controlaterali.
Metastasi a distanza (M)	
MX	Assenza di requisiti minimi per definire la presenza di metastasi a distanza.
M0	Assenza di metastasi a distanza.
M1	Presenza di metastasi a distanza.

Tabella 6 Classificazione TNM del NSCLC.

2.5 Alterazioni dei MicroRNA nel Tumore del Polmone

La variabilità tra le analisi istologiche e la prognosi nel tumore del polmone evidenzia la necessità di metodi più accurati per la classificazione dei tumori del polmone e la stratificazione dei pazienti per le terapie citotossiche tradizionali. I miRNA stanno emergendo come potenziale metodo per la classificazione dei tumori tessuto-specifici; studi preliminari indicano che i profili dei miRNA possono distinguere istologicamente un tumore al polmone squamoso da uno non squamoso [58]. Recentemente è stato osservato che l'espressione del miR-205 è un biomarker altamente specifico per il carcinoma del polmone a cellule squamose [198,199]. Gli autori, dopo successive caratterizzazioni dei profili di espressione dei miRNA hanno dimostrato che il miR-205 distingue i carcinomi a cellule squamose dagli adenocarcinomi con un alto grado di specificità (90%) e sensibilità (96%) [200].

Cancer Metastasis Rev (2010) 29:109–122

115

Experimentally validated miRNAs in lung cancer			
miRNA	Expression in lung cancer	Function when expressed	Validated targets
miR-21	Up	Represses apoptosis Increases proliferation	PTEN [106], PDCD4 [106], TPM1 [141]
miR-17-92	Up	Induces angiogenesis Represses apoptosis	PTEN [112], E2F1-3 [113], BIM [112]
miR-221/222	Up	Represses apoptosis Induces proliferation Restricts angiogenesis	TIMP3 [142] c-Kit [79], p27 ^{Kip1} [52–54]
miR-34a-c	Down	Induces p53-dependent cellular stress responses	CDK4/6 [51, 143], Bel-2 [144], CCNE2 [51], E2F3 [145]
miR-29	Down	Induces apoptosis Decreases tumorigenicity	DNMT3A-3B [39], Mcl-1 [44]
let-7/miR-98	Down	Decreases proliferation Decreases apoptosis	RAS [31], Myc [33], HGMA2 [107], FUS1 [59]
miR-15/16	Down	Induces Rb-dependent cell cycle arrest	Bel-2 [43] CCND1 [114, 117], CCND2 [114], CCNE1 [114], WNT3A [117]
miR-128b	Down	Reduces EGFR-mediated proliferation	EGFR [24]
miR-200/429	Down	Increases E-cadherin expression Represses EMT, reduces metastasis	ZEB1/ZEB2 [94–98]
miR-197	Down	Decreases proliferation	FUS1 [59]
miR-93	Down	Decreases proliferation	FUS1 [59]
miR-126	Down	Reduces invasion, migration, and adhesion Decreases angiogenesis	CRK [100], VEGF-A [75]

Tabella 7 miRNA e rispettivi target validati nel tumore del polmone

Poichè sono state dimostrate variazioni cancro-specifiche per diversi tipi di tumore [201], il profilo di espressione dei microRNA può essere accuratamente usato per identificare il tessuto di origine sia del tumore primario, sia dei tumori metastatici [202]. Diversamente da quanto visto da studi di espressione genica, il grado di variazione dell'espressione dei miRNA è molto più piccolo, suggerendo che questi piccoli cambiamenti di espressione possono avere un effetto significativo sul fenotipo delle cellule, risultato dell'abilità dei microRNA di influenzare simultaneamente l'espressione di centinaia di geni [203].

Nel tumore del polmone sono stati identificati 43 miRNA con un'espressione differente tra il tessuto tumorale e il tessuto normale; tra i miRNA overespressi nel tumore al polmone ci sono: *miR-21*, *-191*, *-210*, *-155*, *-205*, *-17-3p*, *-214*, *-212*, *106a*, *-192*, *-197*, *-146*, *-203*, e *-150*; tra i miRNA downregolati sono stati identificati il *miR-126**, *-143*, *-224*, *-126*, *-30a-5p*, *-149*, *-198*, *-145*, *-95*, *-218*, *-124a*, *-27b*, *-32*, *-29b-2*, *-220*, *-33*, *-101-1*, *-125a*, e *-124a-3* [58,199]. In particolare è stato osservato che l'espressione dei *miR-15a* e *-21* è downregolata sia nel carcinoma a cellule squamose che nell'adenocarcinoma del polmone [204]. Confrontando l'espressione di diversi miRNA nel tessuto tumorale rispetto al tessuto normale in 28 casi pazienti non fumatori affetti da tumore del polmone è stata trovata una upregolazione dei *miR-21*, *-141*, *-210*, *-200b* e *-346*; mentre i *miR-126**, *-126*, *-30a*, *-30d*, *-486*, *-129*, *-451*, *-521*, *-128*, *-30b*, *-30c*, *-516a* e *-520* [205,199].

In un altro studio, esaminando l'espressione dei miRNA in 33 campioni di tumore e corrispettivo sano è stato osservato che l'espressione di tutti i membri della famiglia del *miR-let-7*, ad eccezione del *miR-let-7e* e *miR-222* e *-155*, sono downregolati; mentre i cluster dei *miR-17-92*, *-221*, *-7e* e *-98* risultano upregolati [206]. Esaminando l'espressione dei miRNA in tessuti di carcinoma a cellule squamose, gli autori hanno trovato upregolati i *miR-210*, *-200c*, *-17-5p*, *-20a*, *-203*, *-200a*, *-106b*, *-93*, *-182*, *-83*, *-106a*, *-20b* e *-224*, e downregolati i *miR-let-7e* e *-200a* (Tab.7) [207,199].

2.6 Prognosi del Tumore del Polmone e MicroRNA

Diversi studi hanno dimostrato l'abilità di predire, attraverso il profilo di espressione dei microRNA, l'esito di pazienti affetti da tumore del polmone dopo resezione chirurgica. Nello studio sull'espressione di miRNA nei tessuti di carcinoma a cellule squamose, la ridotta espressione del miR-146b è stata associata con una ridotta sopravvivenza successiva all'intervento chirurgico del tumore con un'accuratezza del 78% e un rapporto di rischio (hazard ratio, HR) di 5.9; per il miR-155, il rischio associato all'espressione è di 2.3 [207,199]; in un altro studio sul polmone, l'associazione dei livelli del miR-155 con la riduzione della sopravvivenza è stata determinata con un rischio di 3.0 [58,199].

Dall'espettorato di pazienti affetti da adenocarcinoma polmonare, sono stati identificati 5 miRNA predittivi per la sopravvivenza con un HR di 2.8 (miR-let7a e miR-221, -137, -372 e -182*), i livelli del miR-let-7a-2 sono stati trovati essere prognostici [208,199], anche se il valore prognostico ottenuto dall'espressione di let-7 non è stato precedentemente osservato nello studio di Takamizawa (2004) [209,199].

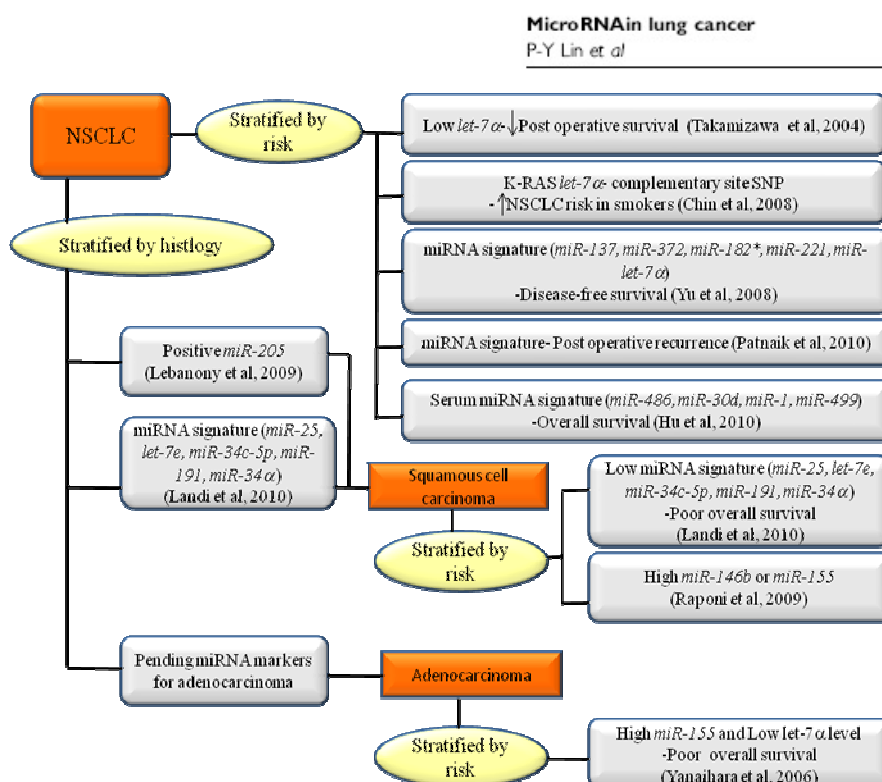


Figura 32 Stratificazione del tumore al polmone basato sui livelli dei miRNA

In un altro studio sono stati analizzati 77 casi di pazienti affetti da NSCLC di stadio I e hanno visto che il pattern di espressione dei miRNA poteva prognosticare la ricomparsa della malattia successivamente all'intervento chirurgico con un'accuratezza del 83% con associato un HR di

9.0 [210,199]. Secondo il lavoro eseguito su 205 casi di NSCLC, la riduzione dell'espressione dei miR-let-7e, -34a, -34c-5p, -25 e -191 è un fattore prognostico di ridotta sopravvivenza tra i fumatori maschi affetti da carcinoma a cellule squamose di stadio I-IIIa, con HR che varia da 0.3 a 0.5 per singolo microRNA [211,199].

Analizzando i polmoni di ratti che avevano vissuto in un ambiente con fumo di sigaretta (environmental cigarette smoke, ECS) è stato osservato che diversi miRNA sono coinvolti nell'attivazione dei pathway di NF- κ B e tra quelli oggetto di studio, il miR-30a, pre-miR-146, miR-132 e miR-155, sono tutti down regolati [212]. Gli autori hanno dimostrato che l'esposizione ad ECS causa l'attivazione di NF- κ B e la traslocazione nucleare, dovuto all'incremento del rilascio di inibitori del NF- κ B per le subunità α , B, γ [213]. Poiché NF κ B ha un ruolo importante nell'infiammazione, ed è tipicamente associato all'esposizione ad ECS, probabilmente la downregolazione nel polmone di questi miRNA contribuisce ai processi infiammatori [212]. La downregolazione indotta da ECS di diversi miRNA appare collegata anche all'induzione della proliferazione cellulare; infatti, alcuni geni codificanti per varie cicline, chinasi cicline-dipendenti, proteinasi della divisione cellulare, sono target diretti di questi miRNA [213]. Ad esempio, la proteina ciclina F, il cui mRNA è un diretto target per *let-7*, ha livelli più alti dopo l'esposizione con ECS [199,214]. Altri miRNA downregolati da ECS sono associati con l'attivazione di geni oncosoppressori, per esempio il miR-34 viene transattivato direttamente da P53 e la sua espressione induce l'arresto del ciclo cellulare [215]. Diversi studi dimostrano una downregolazione di molti miRNA, coinvolti nel silenziare l'attività angiogenica, indotta da ECS, come nel caso di miR-123, miR-222 e miR-34 [215,216, 217]; mentre la downregolazione indotta da ECS su *let-7*, miR-10a e miR-145 promuove l'angiogenesi [212]. Tra i miRNA più fortemente downregolati da ECS ci sono i pre-miR-125a e miR-125b; il miR-125 gioca un ruolo importante nella carcinogenesi del tumore del polmone, ha come target il proto-oncogene ERBB2 che codifica per il recettore dell'EGF, altamente espresso negli adenocarcinomi [218]. I geni dei miR-125 sono localizzati nel cromosoma 11q23-q24 e 21q11.1, regioni frequentemente delete nel tumore del polmone [60,199]; Tuttavia, risulta che il gene del miR-125a è affetto da uno SNP (G/U) all'8 nucleotide; questo SNP blocca il processamento del pri-miRNA a pre-miRNA, rendendolo altamente suscettibile agli agenti genotossici, come ECS, causando la downregolazione di questo miRNA [90].

Infine, la perdita di eterozigotà del miR-128b, presente nel 55% dei casi NSCLC, è stata correlata con un miglioramento della risposta clinica e della sopravvivenza successiva al trattamento con gefitinib. (Fig.32) [199,219].

2.7 Polimorfismi e MicroRNA nel NSCLC

Un emergente paradigma è il ruolo dei polimorfismi di microRNA e mRNA nell'influenzare la stabilità e l'interazione tra i miRNA con i loro mRNA target. Polimorfismi o mutazioni all'interno dei geni possono alterare la loro suscettibilità di regolazione attraverso i miRNA, e questo può permettere alla cellula tumorale di eludere la normale regolazione dei miRNA [51]. In uno studio eseguito su pazienti cinesi affetti da NSCLC, è stata osservata un'associazione tra un particolare polimorfismo CC nel miR-196a-2 nel tumore con un odds ratio di di 1.3 [178]. In un altro lavoro sul tumore al polmone, è stato evidenziato che il genotipo CC incrementa i livelli del miR-196a maturo ma non del pre-miR-196a, suggerendo che le varianti di sequenza hanno effetti sul processamento dei miRNA post-trascrizionalmente [176]. Studiando le varianti di sequenza a carico dei 10 siti di legame del miR-let7 nel 3'UTR del gene di *KRAS* in 54 casi di NSCLC sono state trovate nel 20% dei casi di tumori del polmone rispetto al 6% della popolazione di controllo, suggerendo un rischio di 1.4-2.3. *In vitro* queste varianti alleliche di *KRAS* inducono un aumento dell'espressione proteica di *KRAS* nelle cellule tumorali di polmone A549 [220].

3. OBIETTIVO DELLO STUDIO

I microRNA (miRNA), agiscono come repressori trascrizionali endogeni di geni codificanti per proteine, legandosi ai loro target a livello della regione 3' UTR degli mRNA. Un solo miRNA può regolare centinaia di target differenti, in sedi e tempi diversi. Poiché variazioni anche di un singolo nucleotide a carico della sequenza target possono alterare il meccanismo di regolazione genica operato dai miRNA, gli SNP, che rappresentano le varianti geniche più comuni, sono i candidati ideali per variazioni funzionali di grande interesse in ambito biomedico. Tuttavia, disponiamo ancora di poche informazioni riguardo a questo argomento.

Recenti studi suggeriscono che gli SNP a carico della sequenza del pre-miRNA siano relativamente infrequenti. Solamente il 10% dei pre-miRNA umani è interessato da polimorfismi, e meno dell'1% dei miRNA mostra la presenza di SNP a livello della regione seed. La frequenza degli SNP localizzati a livello di questa regione, nella popolazione, non è ancora disponibile; comunque è probabile che abbiano una bassa frequenza e quindi una scarsa importanza a livello genetico nella popolazione.

Le alterazioni che si verificano in altre zone del pre-miRNA, come a livello dello stelo o della regione loop, potrebbero essere soggette a una minore pressione selettiva, ipotesi coerente con i dati che registrano una maggiore frequenza di questi SNP nella popolazione.

Recentemente sono stati identificati in alcuni tumori umani polimorfismi di sequenza a carico di miRNA. L'interpretazione di queste varianti di sequenza possono essere messe in relazione a alterati livelli di espressione del miRNA stesso o a possibili correlati clinici, incluso la valutazione del loro impatto prognostico. L'obiettivo del nostro studio è stato appunto quello di valutare il ruolo di 4 varianti polimorfe a carico di altrettante sequenze codificanti per miRNA: *hsa-miR-146*, *hsa-miR149*, *hsa-miR-499* e *hsa-miR-196a2*.

Lo studio del genotipo è stato condotto su un gruppo di 98 pazienti affetti da NSCLC e su un gruppo di 129 soggetti sani di controllo comparabili per sesso ed età.

Il primo aspetto da chiarire è collegato all'esatta distribuzione dei diversi genotipi nelle nostre due casistiche, perché per alcuni di questi SNP non è ancora stata depositata la distribuzione delle varianti alleliche nella popolazione caucasica. La classificazione dei pazienti sulla base del loro genotipo ci doveva poi permettere la valutazione in vivo del rapporto eventualmente esistente tra variante polimorfa ed espressione del miRNA stesso.

Dopo questa parte di studio che potremmo definire di valutazione clinica di base, il nostro progetto ha mirato a valutare se l'espressione dei 4 miRNA potesse trovare delle associazioni statistiche con le caratteristiche clinico - patologiche dei pazienti stessi.

L'ultimo aspetto preso in esame è stato quello del valore prognostico dei dati emersi dal nostro studio. A tal fine abbiamo valutato la diversa sopravvivenza nelle diverse classi di pazienti caratterizzati dal presentare i diversi genotipi. Allo stesso modo abbiamo verificato anche la penetranza dell'espressione dei 4 miRNA come indicatori prognostici nel NSCLC.

4. MATERIALI E METODI

4.1 Campioni di Tessuto

Per questo studio sono stati reclutati 98 pazienti in età compresa tra i 37 e gli 82 anni, che sono stati sottoposti a resezione chirurgica per il carcinoma del polmone non a piccole cellule (NSCLC). Da tutti i pazienti è stato ottenuto il consenso informato. Oltre al tessuto tumorale prelevato durante la biopsia, è stato prelevato anche un campione di tessuto apparentemente non affetto dal tumore, che è stato recuperato da ogni paziente e usato come tessuto sano di controllo. I tessuti sani di controllo sono stati prelevati a 3-5 cm dal tumore nella lobectomia ed a 5-7 cm nella pneumonectomia. Campioni di tessuto analoghi sono stati processati per gli esami istologici di *routine*.

I campioni di tessuto, sono poi stati congelati rapidamente e conservati in azoto liquido fino al momento delle analisi. I campioni sono poi stati utilizzati per l'estrazione di DNA e microRNA.

Per entrambe le estrazioni è stato necessario utilizzare il TissueLyser (Qiagen, Milano, Italia) con l'ausilio delle Stainless Steel Beads 5mm (Qiagen, Milano, Italia), per ottenere la disaggregazione dei tessuti.

Per eseguire l'estrazione di DNA è stato utilizzato BIOROBOT EZ1 (Qiagen, Milano, Italia), con l'ausilio del DNA Tissue kit (Qiagen, Milano, Italia), secondo le indicazioni del protocollo. Per l'estrazione dei microRNA, abbiamo utilizzato il mirVanaTM miRNA Isolation Kit (Ambion, Austin, TX, USA), seguendo le indicazioni del protocollo.

Le concentrazioni di miRNA e DNA sono state determinate tramite l'utilizzo di Nanodrop[®] ND-1000 Spectrophotometer. Le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti sono state stabilite in accordo con la classificazione WHO [221] e il sistema di stadiazione TNM [222] e sono riportate in tabella 8.

	Numero
Età	Range: 37-82 Media: 67,2 Mediana: 68
Sesso	
Maschi:	84
Femmine:	14
Fumatori:	
Si	45
Ex	53
Grado differenziativo:	
Basso	20
Medio	69
Alto	9
T:	
1	21
2	67
3	10
N:	
N-	52
N+	46
S:	
I	46
II	19
III-IV	33
Istologia:	
Adenocarcinoma	39
Squamoso	46
Adenosquamoso	13

Tabella 8 Caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti oggetto di studio

4.2 Campioni di Sangue

Abbiamo raccolto anche un campione di sangue da 129 soggetti senza alcuna evidenza di malattia, confrontati per sesso e per età con i pazienti affetti da NSCLC. Il DNA è stato estratto dalle cellule nucleate con il QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen). Da tutti i volontari avevamo ottenuto il consenso informato.

4.3 Genotipizzazione dei Campioni Mediante High Resolution Melting Analysis (HRMA)

L'HRM è una metodica che permette di analizzare mutazioni basandosi sulla denaturazione del DNA, quindi sulla transizione DNAds (doppio filamento) – DNAss (singolo filamento), che si ottiene sottoponendo il campione ad una temperatura crescente. Il profilo di dissociazione che ne scaturisce può essere analizzato con una sensibilità elevata grazie all'utilizzo di uno specifico segnale di fluorescenza, ottenuto attraverso l'emissione di un intercalante.

Mentre la formazione della doppia elica è favorita da interazioni idrofobiche derivanti dall'impacchettamento delle basi e dalla formazione di legami ad idrogeno tra le coppie di basi complementari, la denaturazione del DNA è invece favorita dalla repulsione elettrostatica dei fosfati che si trovano sullo scheletro esterno dei filamenti, dall'aumento dell'entropia conformazionale indotta dalla dissociazione della doppia elica e dalla formazione di legami a idrogeno con l'acqua presente nell'ambiente circostante.

Anche se la conformazione a doppio filamento di DNA risulta relativamente stabile in condizioni fisiologiche, la denaturazione è un processo che avviene comunemente *in vivo* come ad esempio durante il processo di duplicazione, in cui la reazione di separazione dei filamenti, catalizzata dall'enzima elicasi, porta alla formazione di regioni dette "origini di replicazione".

Un altro fattore capace di portare alla denaturazione del DNA è la temperatura in quanto l'entropia dello stato denaturato (random coil) è maggiore rispetto all'entropia dello stato a doppio filamento; in questo modo l'energia termica sposta l'equilibrio della reazione di dissociazione verso la formazione dello stato denaturato, come accade nel caso dell' HRM.

L'High Resolution Melt è un'applicazione della PCR (Polymerase Chain Reaction) per cui, prima di eseguire la denaturazione, la sequenza target deve essere amplificata. Nella miscela di reazione si aggiunge un intercalante fluorescente del DNAds. Gli intercalanti di ultima generazione (SYTO®9, LC Green®, EvaGreen™) hanno il vantaggio, rispetto ai precedenti (ad esempio SYBR® Green I) di avere una bassa "tossicità" per la reazione di amplificazione e possono essere quindi utilizzati in concentrazioni saturanti. Questo aspetto garantisce che il

DNA venga saturato riducendo così il rischio di un nuovo riposizionamento dell'intercalante nelle regioni non denaturate, questo fenomeno di redistribuzione della fluorescenza potrebbe infatti nascondere piccole differenze di comportamento denaturativo. L'intercalante non interagisce con il DNA a singolo filamento, ma si intercala attivamente nel DNA a doppio filamento, emettendo fluorescenza in questo stadio.

In un tipico plot di analisi di melt la fluorescenza inizialmente è alta perché il campione alla fine della reazione di amplificazione è costituito dal solo amplicone di DNA a doppio filamento; appena la temperatura aumenta la fluorescenza diminuisce perché il DNA inizia a denaturarsi.

L'HRM può quindi essere utilizzata per discriminare una piccola porzione di una variante del DNA in un pool di sequenza wild-type, con una sensibilità di approccio pari al 5%; ed è quindi utilizzabile anche per lo studio delle mutazioni somatiche. L'amplicone mutato avrà quindi un comportamento dissociativo differente rispetto all'amplicone wild-type.

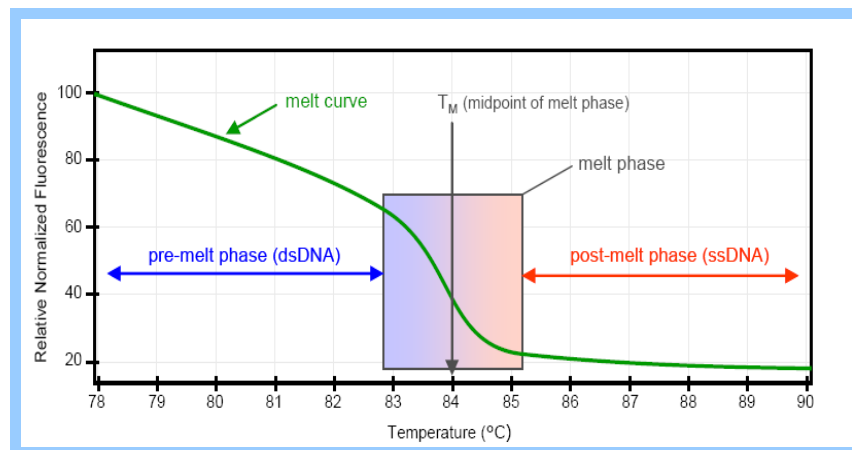


Figura 33 in un plot HRM le mutazioni in omozigosi determinano uno spostamento lungo l'asse della temperatura rispetto alla sequenza wild-type. Le mutazioni in eterozigosi si evidenziano grazie a un cambiamento nella forma della curva legato alla precoce dissociazione dell'eteroduplex.

Se la mutazione è una transizione (sostituzione di una adenina o timina con una guanina o citosina e viceversa), il comportamento dissociativo differente sarà determinato anche dal differente contenuto in GC e lo spostamento della curva di melting sarà maggiore di 0,5°C.

Nell'analisi di SNP le varianti alleliche in omozigosi sono caratterizzate in HRM da uno spostamento lungo l'asse della temperatura. Quando invece le varianti sono in eterozigosi si ha un cambiamento nella forma della curva di melt, che risulta dall'appaiamento degli eteroduplex (filamenti wild-type con i filamenti mutati) (Fig 33-34).

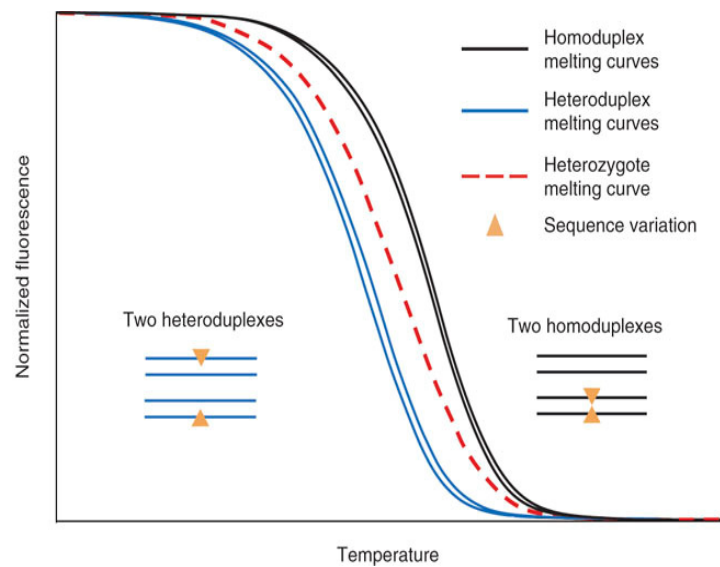


Figura 34 rappresentazione schematica delle curve di dissociazione che si possono ottenere in un' analisi HRM

La curva di melting delle varianti in eterozigosi è quindi data dalle componenti omoduplex ed eteroduplex e proprio a causa di quest'ultima componente che si dissocia prima perché meno stabile, essa ha uno spostamento tipico verso sinistra, ad una temperatura più bassa rispetto alla curva dell'amplicone omozigote mutato.

La presenza dell'eteroduplex si può confermare con il profilo di melting, in cui si evidenzia un secondo picco di melting, rispetto al campione wild-type (Fig.35).

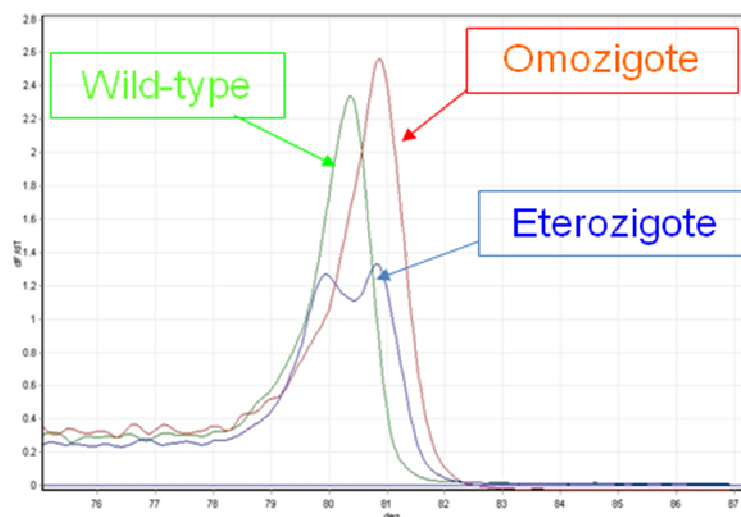


Figura 35: tipico profilo di melting in cui si evidenzia il doppio picco caratteristico dell'eteroduplex.

Quindi i campioni sono stati sottoposti ad un'analisi di HRM per determinare il genotipo a livello degli SNP nei quattro geni codificanti per i miRNA oggetto del nostro studio. Pertanto, sono stati analizzati i seguenti polimorfismi:

- hsa-miR-146a (rs29101164 C>G)
- hsa-miR-149 (rs2292832 T>C)
- hsa-miR-196a2 (rs11614913 C>T)
- hsa-miR-499 (rs3746444 G>A)

La reazione di amplificazione dei campioni è stata eseguita a partire da 100 ng di DNA estratto dai tessuti in un volume finale di 25 µl, secondo il seguente protocollo:

- Buffer 1x– (Applied Biosystems, Monza, Italia)
- MgCl₂ 1,5 mM– (Applied Biosystems)
- dNTPs 800 µM
- Primer forward 300 nM
- Primer reverse 300 nM
- SYTO9 Dye 1,5 µM – (Invitrogen, Carlsbad, CA)
- Taq Gold Polymerase 1U – (Applied Biosystems)

Per la PCR è stato utilizzato il Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems), con denaturazione iniziale a 95°C per 10 minuti, seguita da 35 cicli della durata di 30 secondi a 95°C, annealing di 30 secondi alla temperatura specifica per i primer di ogni gene diverso (vedi tabella 9), poi fase di estensione a 72°C per 20 minuti.

		Primers HRM	Temperature Annealing
miRNA 146	Forward	GGGTCTTTGCACCATCTCTG	57°C
	Reverse	TCCAGTCTTCCAAGCTCTTCA	
miRNA 499	Forward	CGGCTGTTAAGACTTGCAAGT	59°C
	Reverse	CACCCCTTCCCCACAAAC	
miRNA 196	Forward	TCCTCCAGATAGATGCAAAGC	60°C
	Reverse	GAGGGTAGGAGTGGGAGAGG	
miRNA 149	Forward	GTGTCTTCACTCCCGTGCTT	59°C
	Reverse	ACCTCTCACACCCCTCAC	

Tabella 9 sequenze dei primer utilizzati per l'analisi HRM e loro temperature di annealing.

Per il profilo di melting per l'HRMA, è stato utilizzato il RotorGene 6000 (Corbett Research, Sydney, Australia).

L'analisi HRM è stata effettuata secondo le seguenti condizioni:

Hold 1	95 °C	5 minuti
Hold 2	40 °C	1 minuto
Denaturazione	77 → 87 °C miR-146 80 → 90 °C miR-499 80 → 90 °C miR-196 88 → 98 °C miR-149	
Rising Degree	0,05 °C miR-146 0,1 °C miR-499 0,1 °C miR-196 0,1 °C miR-149	

Tabella 10 condizioni utilizzate nell'analisi HRM

I primer per l'HRMA sono stati selezionati utilizzando il software Primer 3. [223] e attraverso Primer-Blast [224].

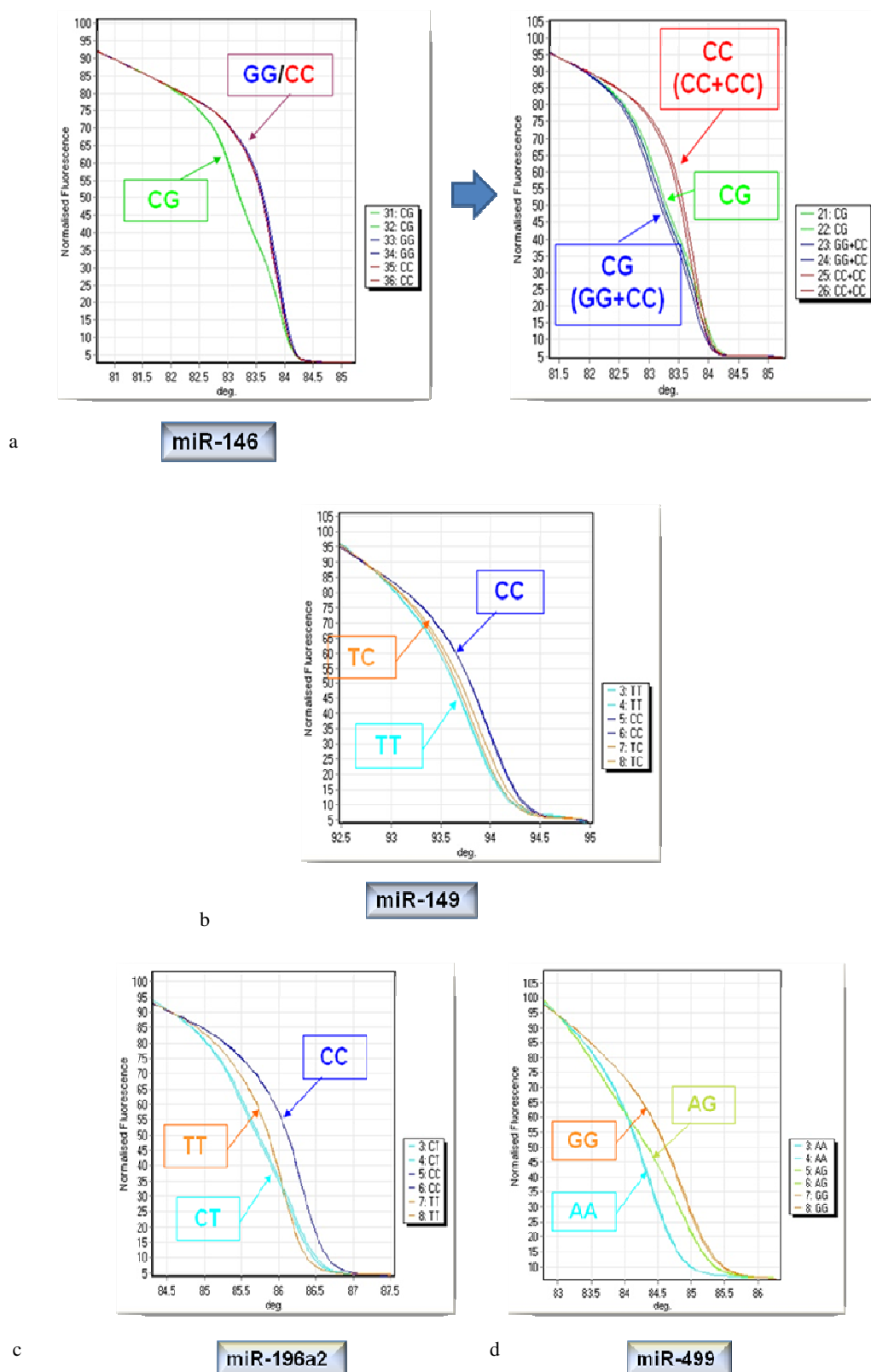


Figura 36 esempi dei plot prodotti dall'HRMA degli SNP dei 4 miRNA oggetto di studio: a. miR-146a (rs29101164 C>G), per questo SNP non si riusciva a discriminare l'allele C dall'allele G, così, per ogni campione omozigote è stata eseguita un'altra PCR in cui il campione ignoto è stato diluito 1:1 con uno standard CC, dall' HRMA si ottiene un profilo CG per quelli il cui genotipo di partenza era GG, mentre quelli con il profilo invariato hanno un genotipo CC; b. miR-149 (rs2292832 T>C); c. miR-196a2 (rs11614913 C>T); d. miR-499 (rs3746444 G>A)

4.4 Sequenziamento

I risultati ottenuti tramite HRMA sono stati confermati mediante sequenziamento, effettuato per tutti i campioni. Dopo l'analisi HRMA i campioni sono stati purificati tramite il PCR Purification Kit (Qiagen). Successivamente gli ampliconi HRMA purificati sono stati sottoposti al protocollo di sequenziamento ciclico con 2µl di BigDye Terminator Ready Reaction Mix (Applied Biosystems), 2µl di Sequencing Buffer e gli stessi primer utilizzati per l'HRMA ma in concentrazione 0,8 µM in un volume finale di 10 µl. Dopo la purificazione con DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen), sono stati analizzati utilizzando il sequenziatore ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) (Fig.37).

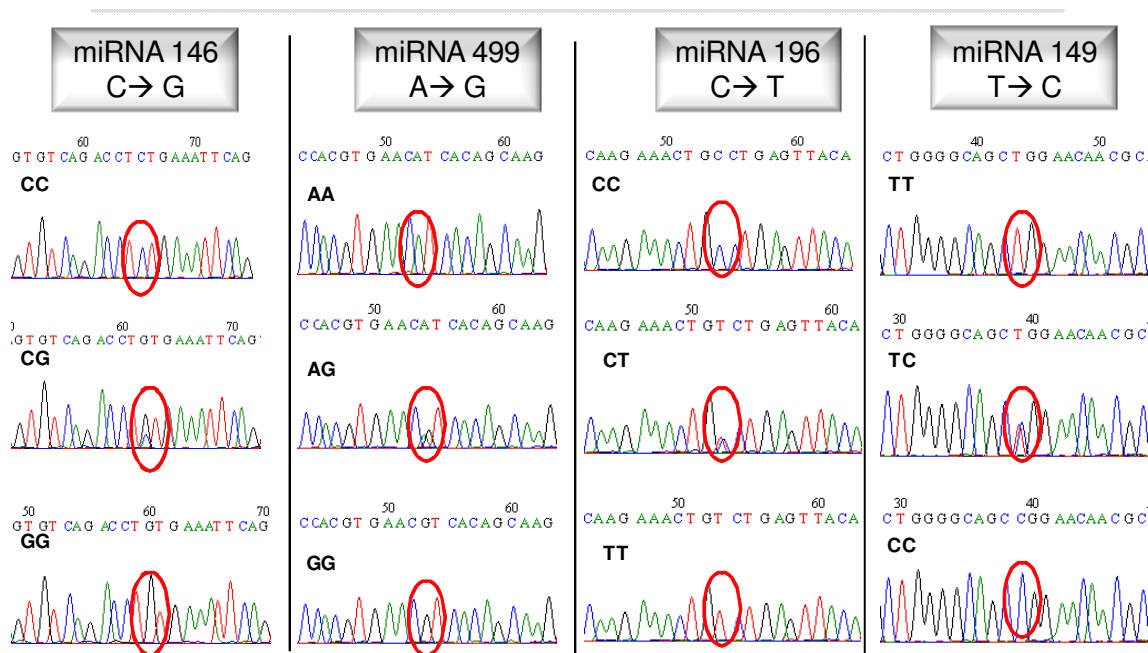


Figura 37 Elettroferogramma dei 3 genotipi dei 4 miRNA studiati

4.5 Real-Time RT-PCR (Reverse Transcription and Real-Time Polymerase Chain Reaction)

I miRNA, estratti dai campioni di pazienti affetti da NSCLC, sono stati sottoposti ad un protocollo di trascrizione inversa (RT), seguita da una real-time PCR quantitativa per valutare il livello di espressione dei miRNA del nostro studio. Per fare questo sono stati utilizzati primer specifici per la retrotrascrizione e Taqman assay per la real-time PCR (TaqMan MiRNA Assay, Applied Biosystems)

- miR-146 (ID 000468)
- miR-149 (ID 000472)
- miR-196 (ID 000495)
- miR-499 (ID 001045)

Inoltre per la retrotrascrizione sono stati utilizzati i reagenti del Taqman[®] MiRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems); mentre per la real-time PCR è stata utilizzata la Taqman 2X Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems).

4.5.1 RT-PCR

L'RT è stata eseguita a partire da 10 ng di miRNA in un volume finale di 15µl, secondo il seguente protocollo:

- RT Buffer 1X
- dNTPs 100µM
- RNase Inhibitor 3,8 U/ul
- MgCl₂ Solution 5,5 mM
- RT Primer 1X
- Multi Scribe reverse Transcriptase 50U

I campioni prima di essere inseriti nel termociclatore devono essere tenuti in ghiaccio per 5 minuti.

I protocolli per RT prevedono il primo step di 30 minuti a 16°C, il secondo step di 30 minuti a 42°C e il terzo step per 5 minuti a 85°C.

I miRNA, essendo piccoli RNA di circa 20-22nt necessitano di particolari primer per la retrotrascrizione, questi presentano un loop in modo tale da appaiarsi alla breve sequenza del miRNA corrispondente e far avvenire la reazione (Fig.38).

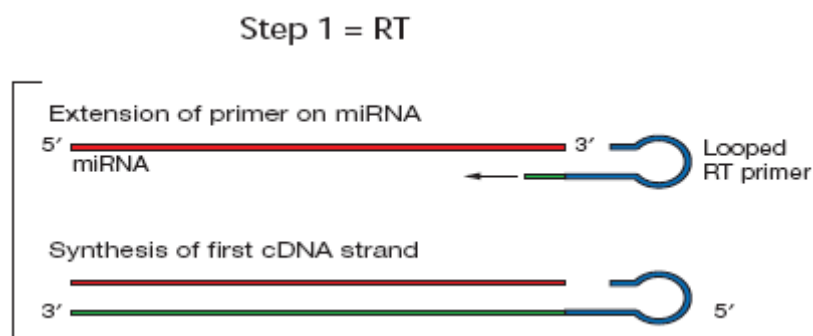


Figura 38 trascrizione inversa dei miRNA.

4.5.2 Real-Time PCR

La Real Time è stata eseguita a partire da 5 ng di cDNA in un volume finale di 20 μ l. I cDNA sono stati amplificati utilizzando il TaqMan MicroRNA Assay insieme con TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) secondo il seguente protocollo:

- TaqMan® Universal Master Mix 2X (10 μ l)
- Real Time Primer 20X (1 μ l)

I primer dotati di loop utilizzati nella fase di trascrizione inversa hanno determinato la sintesi di un cDNA caratterizzato dalla presenza di una porzione aggiuntiva, che migliora la specificità della reazione (Fig.39).

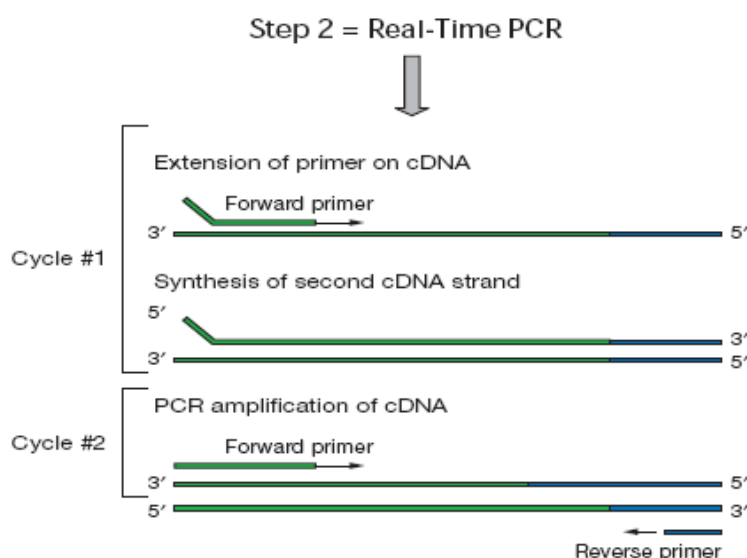


Figura 39 : fase di amplificazione in Real Time PCR dei cDNA.

La specificità della fase di amplificazione è determinata anche dall'utilizzo di una sonda marcata FAMTM dye nella porzione 5' terminale.

Nel nostro studio la Real-Time PCR è stata effettuata utilizzando lo strumento ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems).

4.5.3 Quantificazione dei MiRNA

La quantificazione dei miRNA è stata ottenuta mediante una quantificazione relativa, rapportando la quantità del gene di ogni campione rispetto ad un gene di riferimento housekeeping. Nel nostro caso abbiamo utilizzato il miR-U6B, come riportato in letteratura [176], verso il quale abbiamo normalizzato i dati relativi all'espressione di ciascun gene miRNA tramite l'applicazione della formula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [225].

4.6 Analisi Statistica

Per l'analisi statistica dei dati è stato utilizzato il programma SPSS 15.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois).

Per determinare le frequenze genotipiche in base al principio di Hardy-Weinberg, abbiamo utilizzato il programma HW Calculator.

4.6.1 Legge di Hardy-Weinberg

Secondo la legge di Hardy-Weinberg, una popolazione all' equilibrio è un' entità astratta, non soggetta a evoluzione. Per comprendere quali forze inducono l'evoluzione nelle popolazioni naturali è necessario esaminare le caratteristiche di una popolazione non soggetta a evoluzione. Nel 1908 G. H. Hardy e W. Weinberg definirono "popolazione in equilibrio" una popolazione all'interno della quale né le frequenze alleliche né la distribuzione dei genotipi mutano col succedersi delle diverse generazioni. Non modificandosi le frequenze degli alleli, non si avrebbe, pertanto, evoluzione.

Una popolazione resta in equilibrio solo se in essa si verificano alcune condizioni restrittive:

- non devono verificarsi mutazioni;
- non deve verificarsi un flusso di geni tra popolazioni, cioè non deve esserci una migrazione netta di alleli verso l'interno della popolazione (immigrazione) o verso l'esterno (emigrazione);
- la popolazione deve essere ampia (teoricamente infinita);
- non si deve verificare selezione naturale, vale a dire tutti i genotipi devono possedere le stesse capacità adattative e riproduttive.

Soddisfatte queste condizioni, le frequenze alleliche entro una popolazione rimarranno costanti per un periodo di tempo indefinito. Tale equilibrio è espresso dalla seguente equazione: $p + q = 1$ da cui $(p + q) = p + 2pq + q = 1$

In questa equazione la lettera p indica la frequenza di un allele e la lettera q indica la frequenza dell'altro allele; p più q deve sempre essere uguale a 1 (cioè il 100% degli alleli di quel particolare gene nel pool genico). L'espressione p indica la frequenza di individui omozigoti per un allele, q la frequenza di individui omozigoti per l'altro allele e 2pq la frequenza degli eterozigoti.

Il venir meno di una o più di queste condizioni determina un cambiamento delle frequenze alleliche, cioè un'evoluzione. Pochissime popolazioni naturali sono in perfetto equilibrio. Per la legge di Hardy-Weinberg, cinque sono i fattori principali che governano i mutamenti evolutivi a carico di una certa popolazione:

1. Selezione naturale;
2. Mutazioni, che forniscono il materiale grezzo per il cambiamento, ma le frequenze di mutazione sono generalmente così basse che, di per sé, le mutazioni non determinano la direzione del cambiamento evolutivo;

3. Flusso genico, cioè il movimento di alleli verso l'interno o verso l'esterno del pool genico, può introdurre nuovi alleli o alterare la proporzione degli già presenti. Ha spesso l'effetto di controbilanciare la selezione naturale;
4. Deriva genica, è il fenomeno per cui certi alleli aumentano o diminuiscono di frequenza e, talvolta, anche scompaiono, come risultato di eventi casuali. Esempio di deriva genica è il fenomeno detto "collo di bottiglia";
5. Accoppiamento non casuale, che provoca cambiamenti nelle proporzioni dei genotipi, ma può anche non influire sulle frequenze alleliche [226].

5 RISULTATI

5.1 Distribuzione dei Genotipi nei Tessuti NSCLC e nei Corrispettivi Tessuti Sani

Recentemente Jazdzewski K et al, hanno dimostrato che in circa il 6% dei carcinomi della tiroide, lo SNP a carico del miR-146a poteva subire delle mutazioni somatiche [92]. Quindi il nostro primo obbiettivo è stato quello di testare se la trasformazione nei NSCLC poteva indurre selettive modificazioni alle varianti alleliche dei quattro miRNA studiati in questo studio. Per questo motivo il DNA è stato estratto da tutti tessti NSCLC e il corrispettivo sano per analizzare la loro distribuzione del genotipo. Ciò che abbiamo osservato è che in tutti i campioni il genotipo del tessuto sano del miRNA corrispondeva esattamente con quello trovato nel tessuto tumorale. Questa scoperta sembra escludere che nei NSCLC, la trasformazione cellulare possa determinare modificazioni nella sequenza dei quattro miRNA.

5.2 Frequenza Allelica e Distribuzione dei Genotipi nei Pazienti con NSCLC e Controlli

La frequenza dei 4 SNP è stata testata in 98 pazienti affetti da NSCLC e confrontati con 129 soggetti di controllo, assortiti per sesso e età. La distribuzione del miR-149, miR-196a2 e miR-499 non ha rilevato alcuna differenza tra i casi e i controlli (Tab. 11).

SNP	Genotipo	NSCLC (%)	Controlli (%)	OR	95% CI	P
miR-146a (rs2910164 C-G)	GG	43 (43.8)	73 (56.6)	1.00		
	CG	47 (47.9)	45 (34.9)	1.77	1.02-3.09	0.042
	CC	8 (8.2)	11 (8.5)	1.23	0.46-3.31	0.674
	[G] vs [C]					0.149
miR-149 (rs2292832 C-T)	CC	43 (43.9)	65 (50.4)	1.00		
	TC	40 (40.8)	53 (41.1)	0.77	0.43-1.36	0.359
	TT	15 (15.3)	11 (8.5)	1.20	0.50-2.92	0.679
	[C] vs [T]					0.103
miR-196a2 (rs11614913 C-T)	CC	34 (34.7)	58 (45.0)	1.00		
	CT	53 (54.1)	61 (47.2)	1.48	0.85-2.60	0.108
	TT	11 (11.2)	10 (7.8)	1.88	0.72-4.88	0.192
	[C] vs [T]					0.126
miR-499 (rs3746444 G-A)	AA	52 (53.1)	70 (54.2)	1.00		
	AG	40 (40.8)	48 (37.2)	1.15	0.66-2.01	0.613
	GG	6 (6.1)	11 (8.6)	0.72	0.25-2.08	0.548
	[A] vs [G]					0.914

Tabella 11 Frequenze alleliche e genotipiche dei miRNA in pazienti con NSCLC (n=98) e nei soggetti di controllo (n=129)

Invece l'analisi del miR-146a ha mostrato una significativa differenza nella distribuzione del genotipo tra casi e controlli. In particolare, la frequenza del CG è significativamente più alta nei pazienti affetti da NSCLC (47.9%) rispetto ai controlli (34.9%) (CG vs GG: OR =1.77, 95% CI 1.02-3.09, $p=0.042$). La distribuzione del genotipo dei quattro miRNA tra pazienti con NSCLC e i controlli sani è stata trovata all'equilibrio, secondo la legge di Hardy-Weinberg.

5.3 Espressione dei MiRNA nei Tessuti NSCLC e nel Corrispettivo Tessuto Sano

Successivamente abbiamo determinato i livelli di espressione dei quattro miRNA nei tessuti NSCLC e nel corrispondente tessuto sano. I nostri risultati hanno evidenziato che i miR-146a, miR-196a2 e il miR-149 sono costantemente espressi in tutte le coppie di tessuti. Invece, i livelli del miR-499 sono stati trovati molto bassi e sono stati rilevati in 68/98 NSCLC, ma solo in 10 coppie di tessuti.

L'espressione relativa del miR-146a ($\text{media} \pm \text{SE}$) è stata confrontata tra i tessuti NSCLC (1769 ± 482) e nel corrispondente tessuto sano (1548 ± 274). Per il miR-149 è stato impossibile dimostrare delle differenze tra gli NSCLC (47 ± 22) e il corrispondente tessuto sano (22.3 ± 5.4). Per il miR-499, a causa del numero limitato di campioni non tumorali rilevabili, il confronto tra le coppie di NSCLC (2.3 ± 1.0) e il tessuto sano (23.9 ± 11.9) ha un valore statistico limitato. L'espressione del miR-196a2 ha un incremento significativo ($p < 0.001$) tra i NSCLC (33.7 ± 8.9) rispetto al corrispondente tessuto sano (1.96 ± 0.5) (tab.12)

	miR-146a	miR-149	miR-196a2	miR-499x1000
NSCLC	1769± 482	47± 22	33.7± 8.9	2.3±1.0
Controlli	1548± 274	22.3± 5.4	1.96± 0.5	23.9± 11.9
p	0.672	0.225	<0.001	0.123

Tabella 12 Espressione dei miRNA nei tessuti NSCLC e nei corrispettivi tessuti sani

5.4 Espressione e Genotipo dei MiRNA nei Tessuti Sani

Successivamente abbiamo analizzato la possibile reazione tra il genotipo dei miRNA e la loro espressione. Le prime analisi di quantificazione sono state eseguite sui campioni di tessuto sano recuperato durante la biopsia all'interno di aree non tumorali; abbiamo ipotizzato che, anche se questi campioni non possono considerarsi un vero tessuto sano, essi rappresentano i campioni che meglio identificano l'espressione fisiologica nel polmone. Solo nel caso del miR-146a abbiamo trovato una significativa differenza tra la media dell'espressione e i genotipi, visto che l'espressione nel gruppo GG è significativamente più alta rispetto al CG ($p < 0.05$). Per il miR-149 non abbiamo trovato nessuna connessione tra il genotipo e l'espressione, mentre il miR-196a2 tendeva ad avere la massima espressione nei pazienti CC se confrontati con i pazienti TT, senza però raggiungere la significatività. Nel caso del miR-499, l'analisi è stata possibile solo nei 10 pazienti in cui la sua espressione è stata rilevata, ma nessuna indicazione è stata deducibile. (Fig.40).

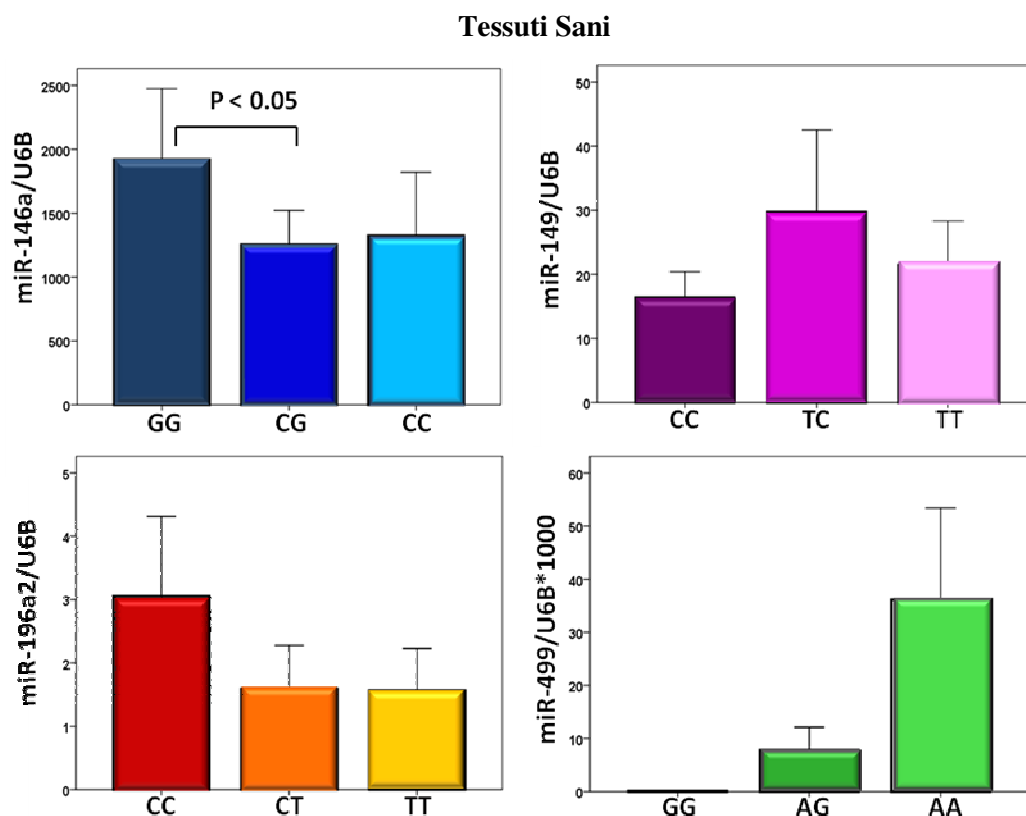


Figura 40 Espressione dei miRNA nel tessuto sano del polmone suddiviso in base al genotipo

5.5 Espressione e Genotipo dei MiRNA nei Tessuti NSCLC

Successivamente nei 98 NSCLC è stata confrontata l'espressione di ogni miRNA rispetto al suo genotipo; abbiamo quindi confrontato i risultati ottenuti con quelli dei rispettivi tessuti sani. L'analisi dei risultati sembra indicare che nei tessuti tumorali solo il miR-196a2 mantiene un profilo di espressione confrontabile con il tessuto sano di polmone; così abbiamo confermato una significativa associazione tra il genotipo CC e un'alta espressione, mentre il genotipo TT ha evidenziato una più bassa espressione confrontata con il CT ($p=0.005$) e con il CC ($p<0.01$) (fig 41). Una differenza statisticamente significativa è stata dimostrata anche tra CC e CT ($p=0.027$). Per gli altri tre miRNA abbiamo rilevato evidenti discrepanze nel loro profilo di espressione tra il tessuto patologico e quello sano. Nel caso del miR-146a, il genotipo CG sembra associato ad una alta espressione del rispettivo miRNA. Per il miR-149 la massima espressione è associata con il genotipo CC. Ancora una volta dobbiamo considerare il limitato valore del confronto dei risultati per il miR-499 dovuto al limitato numero di campioni sani confrontabili (Fig. 41).

Tessuti Tumorali

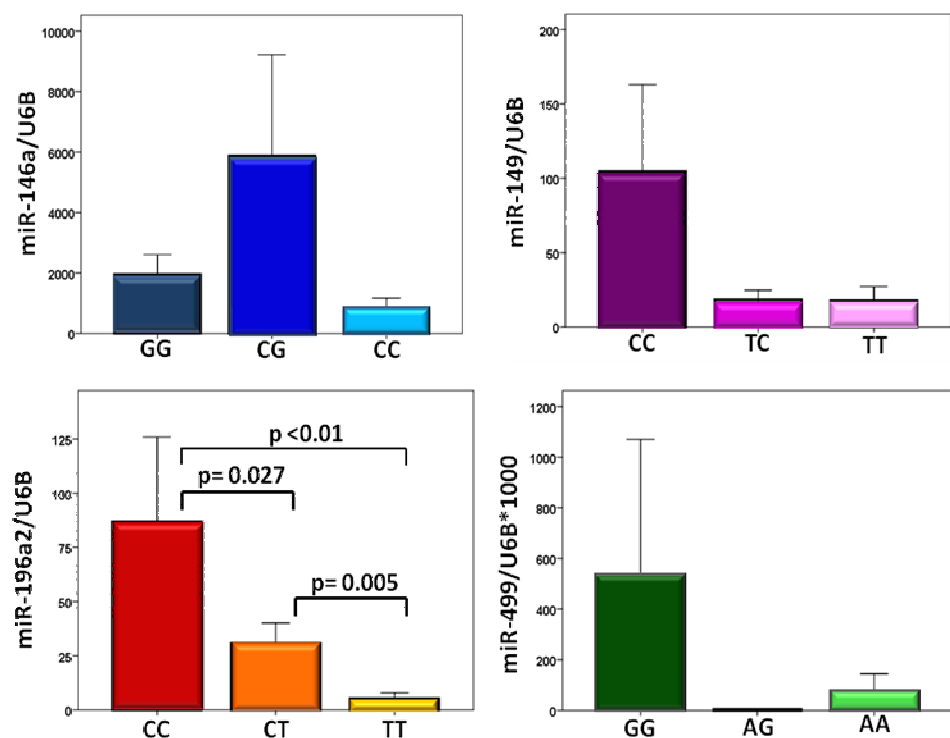


Figure 2

Figura 41 Espressione dei miRNA nei NSCLC suddivisi in base al rispettivo genotipo

5.6 Espressione dei MiRNA nei NSCLC e Caratteristiche Cliniche

Come mostrato nella tabella 13, non abbiamo trovato alcuna relazione tra l'espressione di un singolo miRNA e le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti affetti da NSCLC. La sola eccezione è rappresentata dall'associazione tra l'incremento di espressione del miR-499 e l'alto grado del tumore.

		miR-146a	miR-499	miR-196a2	miR-149
Sesso	Maschi (n=84)	2105± 615.9	10.6± 5.2	38.9±11.2	64.5±32.5
	Femmine (n=14)	3053±1734	2.6±0.8	32.5±17.0	31.9±16.8
		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Età	<55 (n=12)	2237±1240	44.9±37.6	93.9±46.0	42.7±23.2
	≥55 (n=86)	1810±359	4.7±1.2	33±11.0	64.5±33.9
		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Fumatori	Si(n=45)	2295±1050	4.6±2.8	61.5±23.2	78.9±63.5
	Ex (n=53)	2714±874	15.4±8.8	30.2±10.2	51.6±29.1
		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Grado	Basso(n=20)	2150±978	3.6±1.4	42.2±25.4	97.8±72.8
	Medio (n=69)	1726±643	4.7±1.4	30.3±13.3	62.4±40.2
	Alto (n=9)	5949±4537	57.6±52.6	48.4±18.7	41.2±38.2
		n.s.	p=0.008	n.s.	n.s.
T	1 (n=21)	3306±1932	5.2±3.3	11.9±5.5	22.8±10.5
	2 (n=67)	1442±398	4.3±0.9	43.0±15.1	85.0±44.6
	3 (n=10)	3518±2801	1.3±0.6	20.5±11.6	22.9±16.1
		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
N	N- (n=52)	2492±896	3.3±0.7	44.9±18.0	71.6±50.5
	N+ (n=46)	1458±537	5.8±2.2	21.5±8.9	61.1±34.5
		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
S	1 (n=46)	2168±880	3.5±0.8	48.5±20.6	81.0±57.9
	2 (n=19)	2248±1.35	3.0±1.1	40.4±18.8	82.59±72.7
	3-4 (n=33)	1725±769	7.2±3.5	10.1±3.8	35.8±12.0
		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Istologia	Adenocarcinomi (n=39)	1871±650	21.0±13.1	43.2±23.5	96.5±78.7
	Squamosi (n=46)	3220±1290	3.1±1.1	43.3±14.6	63.2±36.5
	Adenosquamosi (n=13)	736±366	1.5±0.9	4.7±2.4	7.3±3.1
		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tabella 13 Espressione dei miRNA e le caratteristiche cliniche in 98 pazienti affetti da NSCLC

5.7 Genotipi e Sopravvivenza

Le curve di Kaplan-Meier, non mostrano nessuna associazione statistica tra i miR-146a, miR-196a2, miR-499 e la sopravvivenza dei pazienti. Invece abbiamo osservato che unendo i pazienti NSCLC con il genotipo CC con quelli TC del miR-149 si è ottenuto un incremento significativo della sopravvivenza rispetto ai pazienti TT ($p < 0.05$) (Fig 42).

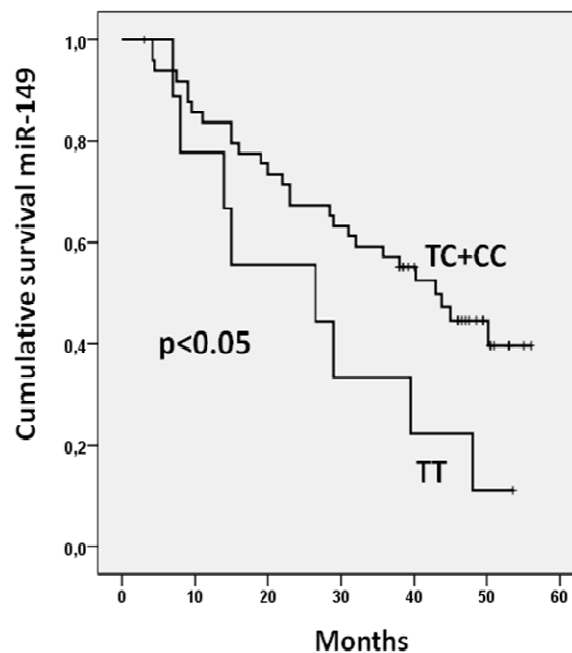


Figura 42 Kaplan-Meier, analisi della sopravvivenza nei 98 pazienti con NSCLC con il genotipo TT vs il genotipo TC e CC.

5.8 Significato Prognostico dell'Espressione dei MiRNA

Abbiamo ripetuto l'analisi di Kaplan-Meier dopo aver stratificato i pazienti secondo un cut-off corrispondente alla mediana dei livelli di espressione di ogni miRNA nei NSCLC. L'analisi di sopravvivenza è stata ottenuta confrontando pazienti con alto grado di espressione ($>$ valore della mediana) versus pazienti con bassa espressione ($\leq$ valore della mediana). Secondo questa suddivisione, non abbiamo trovato significative relazioni tra le espressioni dei quattro miRNA e un esito sfavorevole e un tempo di sopravvivenza minore.

6. CONCLUSIONI

Nel presente studio abbiamo valutato la distribuzione del genotipo e l'espressione del miR-196a2 (rs11614913 C-T) così come quella del miR-146a (rs2910164 C-G) miR-149 (rs2292832 C-T) e miR-499 (rs3746444 G-A) in 98 pazienti affetti da NSCLC. Il nostro studio si è focalizzato sulla valutazione del loro profilo di espressione tra le coppie di tessuto tumorale e corrispettivo sano, per valutare meglio come il genotipo e la trasformazione cellulare possano influenzare l'espressione dei miRNA. I nostri risultati, basati sull'analisi simultanea delle coppie di tessuto, tendono ad escludere che gli SNP in questi miRNA possano essere mutazioni somatiche acquisite durante la trasformazione neoplastica, in contrasto con quanto recentemente dimostrato per il miR-146a nel carcinoma papillare della tiroide.

Nell'analisi caso-controllo della distribuzione del genotipo del miR-149, miR-196a2 e miR-499 non è stata trovata nessuna associazione con l'incremento del rischio di incidenza del NSCLC. Invece, il miR-146a ha rivelato una significativa differenza nella distribuzione del genotipo, essendo CG il genotipo significativamente associato a NSCLC ($p=0.042$ and 1.77 OR). Nel tessuto di polmone sano, l'espressione del miR-146a è apparentemente connessa al suo genotipo, essendo significativamente più alta nei pazienti GG ($p<0.05$) rispetto ai CG e CC. Al contrario, il profilo di espressione dello stesso miRNA nelle coppie di NSCLC ha mostrato una tendenza con la massima espressione nel genotipo CG (circa 6 volte maggiore della media), connesso con un maggior rischio di NSCLC. Apparentemente questa tendenza a sviluppare NSCLC è fortemente connessa all'incremento di una correlata espressione dei miRNA, ma limitata allo specifico genotipo CG. Per quanto riguarda il significato prognostico del miR-146a, non abbiamo rilevato una correlazione né con la sopravvivenza dei pazienti né con il genotipo specifico. Anche nel caso del miR-149 (rs2292832 C-T) la coppia di tessuti tumorale e sano hanno mostrato una differente tendenza di espressione in base al loro genotipo. Nei tessuti normali, l'espressione dei miRNA non sembra influenzata dal rispettivo genotipo. In corrispondenza dei campioni NSCLC, il genotipo CC sembra associato ad un incremento dell'espressione dei miRNA (circa 6 volte di più rispetto alla media); in questo caso la presenza di alti livelli dell'espressione del miR-149 sembrano avere un effetto protettivo, come dimostrato dal significativo miglioramento della sopravvivenza nei gruppi CC o CT rispetto ai pazienti TT ($p<0.05$). Per i due miRNA rimanenti, il livello di espressione è simile tra i tessuti sani e i tessuti tumorali. In particolare per il miR196a2 la massima espressione è associata al genotipo CC e quello minimo al TT. Quindi la significativa upregolazione dell'espressione del miR-196a2 nei NSCLC rispetto ai corrispettivi tessuti sani ($p<0.001$), riportata anche in altri tipi di tumori [174,175], appare indipendente dal genotipo dei nostri pazienti affetti da NSCLC. Secondo i nostri risultati, altri meccanismi indipendenti dal genotipo sono responsabili

dell'alterazione del miR-196a2 rilevati nei NSCLC così come in altri tipi di cancro, come l'amplificazione genica, alterazioni dei fattori trascrizionali, meccanismi epigenetici (ad esempio la metilazione del DNA) [227].

Infine il significato clinico del miR-499 nei NSCLC appare limitato; non abbiamo trovato alcuna rilevante associazione tra il genotipo e l'espressione ne nel tessuto sano ne nei tessuti tumorali, con una più alta espressione rilevabile nei pazienti portatori del genotipo AA. Nessuna associazione è stata dimostrata con la sopravvivenza dei pazienti. Tuttavia abbiamo trovato un'associazione tra l'incremento dell'espressione e tumori di alto grado solo per il miR-499. In conclusione i nostri risultati sembrano dimostrare che, nei nostri pazienti, il genotipo CG del mir-146a è connesso ad un incremento del rischio per NSCLC, presumibilmente attraverso l'associazione con l'incremento dell'espressione dei miRNA. Il genotipo CC del miR-149 sembra rappresentare un fattore predittivo di una migliore prognosi, associato ad un'espressione incrementata del miRNA in questo gruppo di pazienti affetti da NSCLC. Infine, abbiamo confermato che il miR-196a2 è upregolato nei pazienti NSCLC ma, almeno nei nostri pazienti, in maniera indipendente dal genotipo.

MIRNA NEL CRC

7. TUMORE DEL COLON-RETTO (CRC)

7.1 Epidemiologia del CRC

L'intestino è l'organo deputato all'assorbimento delle sostanze nutritive che provengono dall'alimentazione. È un tubo della lunghezza di circa 7 metri (ma può variare dai 4 ai 10 metri o anche più) suddiviso in intestino tenue, o piccolo intestino (a sua volta ripartito in duodeno, digiuno e ileo) e intestino crasso o grosso intestino. Quest'ultima parte è formata dal colon destro o ascendente (con l'appendice), dal colon trasverso, dal colon sinistro o discendente, dal sigma e dal retto (Fig.43).

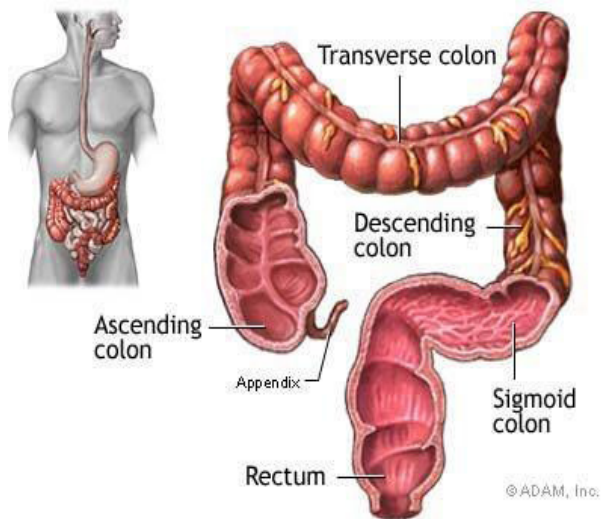


Figura 43: Rappresentazione del colon e del retto

Il tumore del colon-retto è dovuto alla proliferazione incontrollata delle cellule della mucosa che riveste questo organo. C'è anche chi distingue tra tumore del colon vero e proprio e tumore del retto, ovvero dell'ultimo tratto dell'intestino, in quanto possono manifestarsi con modalità e frequenze diverse.

Nei Paesi occidentali il cancro del colon-retto rappresenta il terzo tumore maligno per incidenza e mortalità, dopo quello della mammella nella donna e quello del polmone nell'uomo [228]. Ogni anno negli Stati Uniti, sono diagnosticati 160000 casi di tumore del colon-retto e 57000 pazienti muiono per questa malattia, principalmente a causa di metastasi al fegato e ai polmoni (Fig.44) [229,230].

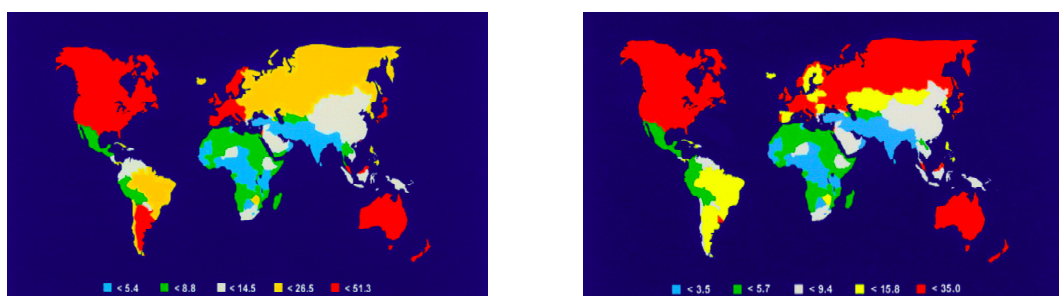


Figura 44 Incidenza (A) e mortalità (B) mondiale del cancro al colon-retto nella popolazione maschile.

La malattia, abbastanza rara prima dei 40 anni, è sempre più frequente a partire dai 60 anni, raggiunge il picco massimo verso gli 80 anni e colpisce in egual misura uomini e donne. Negli ultimi anni si è assistito a un aumento del numero di tumori del colon, ritenuto una diretta conseguenza indotta dai cambiamenti nella dieta, dallo stile di vita, soprattutto dall'assunzione di alcool e dall'inattività fisica [231,232]. Il 70% dei pazienti si presenta alla diagnosi con malattia chirurgicamente aggredibile e il 30% con metastasi. Tra i pazienti sottoposti ad asportazione chirurgica, il 25% presenterà un ripresa di malattia dopo un tempo variabile. Nonostante i progressi ottenuti dalla ricerca per l'identificazione di nuovi strumenti prognostici e predittivi per il CRC, le decisioni sui trattamenti si basano ancora quasi esclusivamente sullo stadio del tumore, tramite valutazioni radiologiche e/o patologiche. Questo causa un fallimento non solo nell'identificazioni di pazienti ad alto rischio e basso, ma anche nella somministrazione di trattamenti insufficienti o non necessari [230]. Questo mette in luce la necessità di nuovi strumenti di screening e biomarker diagnostici, così come nuovi trattamenti antitumorali [233].

7.2 Eziologia del CRC

Molte sono le cause che concorrono a determinare la malattia: tra queste ci sono alcune legate allo stile di vita, altre alla dieta e all'alimentazione, altre genetiche e altre di tipo non ereditario [233,234].

Fattori nutrizionali: molti studi dimostrano che una dieta ad alto contenuto calorico, cioè ricca di grassi animali e povera di fibre, e ad alto contenuto di bevande alcoliche, è associata a un aumento dei tumori intestinali; viceversa, diete ricche di fibre (cioè caratterizzate da un alto consumo di frutta e vegetali) sembrano avere un ruolo protettivo[233,234].

Fattori genetici: è possibile ereditare il rischio di ammalarsi di tumore del colon-retto se nella famiglia d'origine si sono manifestate alcune malattie che predispongono alla formazione di tumori intestinali. Tra queste sono da segnalare le poliposi adenomatose ereditarie (tra cui la poliposi adenomatosa familiare o FAP, la sindrome di Gardner e quella di Turcot) e quella che viene chiamata carcinosi ereditaria del colon-retto su base non poliposica (detta anche HNPCC o sindrome di Lynch). Si tratta di malattie trasmesse da genitori portatori di specifiche alterazioni genetiche, che possono presentarsi senza alcun sintomo. La probabilità di trasmettere alla prole il gene alterato è del 50%, indipendentemente dal sesso [233,234].

Fattori non ereditari: è importante l'età (l'incidenza è 10 volte superiore tra le persone di età compresa tra i 60 e i 64 anni rispetto a coloro che hanno 40-44 anni), le malattie infiammatorie croniche intestinali (tra le quali la rettocolite ulcerosa e il morbo di Crohn), il fumo da sigaretta, il sesso maschile, il diabete mellito, l'obesità e una storia clinica passata di polipi al colon o di un pregresso tumore del colon-retto. Polipi e carcinomi che non rientrano tra le sindromi ereditarie illustrate sopra vengono definiti "sporadici", sebbene anche in questo caso sembra vi sia una certa predisposizione familiare. Si stima che il rischio di sviluppare un tumore del colon aumenti di 2 o 3 volte nei parenti di primo grado di una persona affetta da cancro o da polipi del grosso intestino [233,234].

7.3 Tipologie del CRC

La maggior parte dei tumori del colon-retto deriva dalla trasformazione in senso maligno di polipi, ovvero di piccole escrescenze, di per sé benigne, dovute alla proliferazione delle cellule della mucosa intestinale. Il polipo può essere definito, in base alle sue caratteristiche, sessile (cioè con la base piatta) o peduncolato (ovvero attaccato alla parete intestinale mediante un piccolo gambo). Non tutti i polipi sono a rischio di malignità (Fig.45).

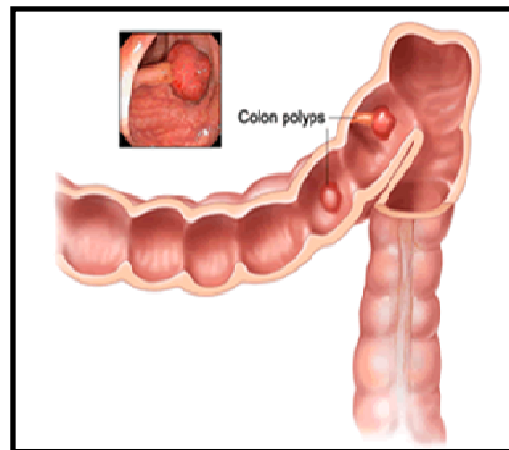


Figura 45: Polipo

Ve ne sono infatti tre diversi tipi:

- i polipi iperplastici (caratterizzati da una mucosa a rapida proliferazione);
- i polipi amartomatosi (detti anche polipi giovanili e polipi di Peutz-Jeghers);
- i polipi adenomatosi.

Solo i polipi adenomatosi costituiscono lesioni precancerose e di essi solo una piccola percentuale si trasforma in neoplasia maligna.

La probabilità che un polipo del colon si evolva verso una forma invasiva di cancro dipende dalla dimensione del polipo stesso: è minima (inferiore al 2%) per dimensioni inferiori a 1,5 cm, intermedia (2-10%) per dimensioni di 1,5-2,5 cm e significativa (10%) per dimensioni maggiori di 2,5 cm.

Una volta trasformatasi in tessuto canceroso, la mucosa intestinale può presentarsi con caratteristiche diverse a seconda dell'aspetto visibile al microscopio, e di conseguenza prendere un nome diverso:

- adenocarcinoma;
- adenocarcinoma mucinoso;
- adenocarcinoma a cellule ad anello con castone (più raro).

Inoltre tutti i cancro del colon-retto possono avere un aspetto a polipo, a nodulo oppure manifestarsi con ulcere della mucosa [234]. Le modalità di intervento per il CRC possono variare in base all'estensione del tumore e alla sua localizzazione. Fra le più comuni ci sono innanzitutto l'asportazione endoscopica di polipi benigni o anche di polipi con un'iniziale trasformazione maligna superficiale. Il passaggio successivo è l'intervento chirurgico, che prevede la resezione totale del tessuto neoplastico, indicato soprattutto per il trattamento delle forme localizzate

nei pazienti privi di metastasi; sono

spesso utilizzate come terapia antitumorale la chemioterapia e la radioterapia.

7.4 Diagnosi e Stadiazione del CRC

La diagnosi del tumore del colon-retto si avvale dell'esame clinico, che consiste nella palpazione dell'addome alla ricerca di eventuali masse a livello dell'intestino, del fegato e dei linfonodi, e nell'esplorazione rettale.

In aggiunta alla clinica esistono poi diverse indagini strumentali che permettono di diagnosticare

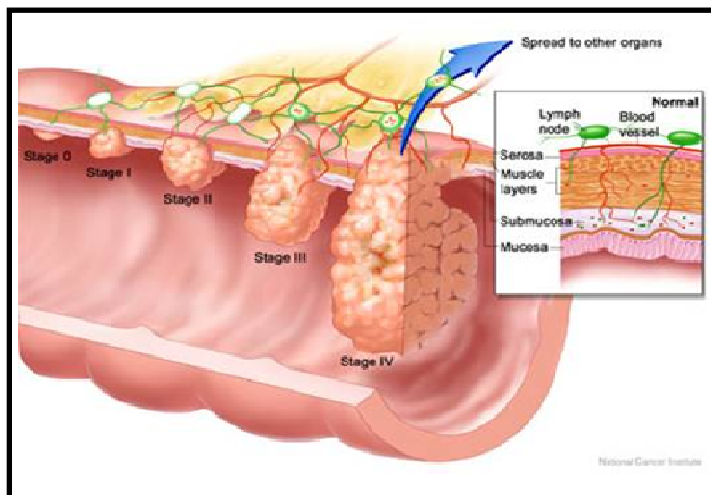


Figura 46 Evoluzione del tumore CRC, da polipo a carcinoma

il tumore e, in seguito, di eseguirne la stadiazione, ovvero di valutarne la gravità; tra quelli più specifici c'è la colonscopia. Tra i molti sistemi proposti per la stadiazione dei tumori del colon-retto, c'è quello di Duke ideato nel 1932 (Tab. 14), modificato circa 20 anni dopo da Astler e Collier (Tab.15 e Fig 46).

STADIO 1	Neoplasia confinata entro la parete intestinale.
STADIO 2	Neoplasia che si stende oltre la parete intestinale.
STADIO 3	Neoplasia con metastasi linfonodali.
STADIO 4	Metastasi a distanza.

Tabella 14 Classificazione di Duke

STADIO A	Neoplasia confinata entro la parete intestinale.
STADIO B1	Neoplasia che invade la muscolare propria ma non si estende oltre.
STADIO B2	Neoplasia che si estende oltre la muscolare propria.
STADIO C1	Come B1 ma con metastasi linfonodali.
STADIO C2	Come B2 ma con metastasi linfonodali.
STADIO D	Metastasi a distanza.

Tabella 15 Classificazione di Astler e Coller

Lo stadio iniziale della malattia è il più importante fattore predittivo della sopravvivenza che risulta essere, a 5 anni, nell'85-90% per i pazienti in stadio A di Dukes e di circa il 60% per quelli in stadio B; tale sopravvivenza si riduce ulteriormente ad un valore del 40% in caso di coinvolgimento linfonodale ed è inferiore al 5% in caso di metastasi a distanza. Dopo l'asportazione chirurgica radicale, la sopravvivenza globale a 5 anni varia dal 55% al 75%, mentre dopo la resezione chirurgica presuntivamente curativa per metastasi epatiche o polmonari, è del 25-30% [234].

Contrariamente agli altri tipi di cancro, per i quali esiste una classificazione pressoché univoca, per il tumore del colon-retto esistono diverse forme di classificazione; la più usata resta comunque quella che si riferisce al sistema TNM (dove T sta per la dimensione del tumore, N per il numero di linfonodi coinvolti e M per le metastasi) (Tab. 16).

Estensione del tumore primitivo (T)

TX non definibile il tumore primitivo

T0 non segni del tumore primitivo

Tis in situ, intraepiteliale o invasione della lamina propria

T1 invade la sottomucosa

T2 invade la muscolare propria

T3 invade la sottosierosa, i tessuti pericolici non rivestiti da peritoneo o i tessuti perirettali

T4 invade altri organi o perfora il viscere

Linfonodi regionali (N)

NX non definiti

N0 assenza di metastasi nei linfonodi regionali

N1 metastasi in 1-3 linfonodi pericolici

N2 metastasi in più di 4 linfonodi pericolici

NOTA: la corretta stadiazione patologica dell'invasione linfonodale (N) richiede l'asportazione di almeno 12 linfonodi.

Metastasi a distanza (M)

MX non accertabili

M0 non metastasi

M1 metastasi a distanza

Tabella 16 Classificazione TNM

7.5 Meccanismi Molecolari del CRC

Il comportamento clinico del CRC deriva dalle diverse interazioni molecolari che cambiano la sua suscettibilità, alterando fattori che possono indurre lo sviluppo del tumore, guidare la sua progressione e determinare la risposta o la resistenza ai farmaci antitumorali. Tra questi c'è l'instabilità genomica, l'inattivazione mutazionale di geni oncosoppressori e l'attivazione di oncogeni (Fig. 47) [235].

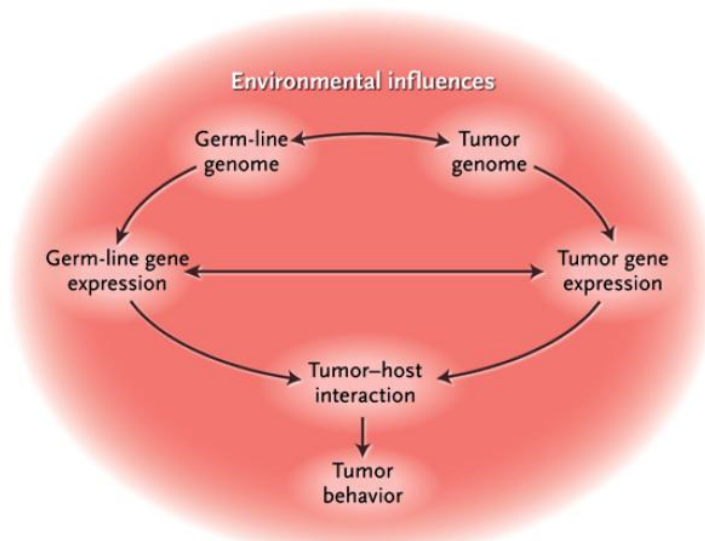


Figura 77 Carcinogenesi colon-rettale infiammatoria

7.5.1 Instabilità Genomica

Il più comune tipo di instabilità genomica nel tumore del colon-retto è **l'instabilità cromosomica**, che causa numerosi cambiamenti nel numero di copie e nella struttura dei cromosomi. L'instabilità cromosomica è un meccanismo sufficiente per causare la perdita di una copia wild-type di un gene oncosoppressore, come APC, P53, e i membri della famiglia SMAD 4 (SMAD4), la cui attività

fisiologica è quella di opporsi al fenotipo maligno [236,237, 238]. Nel CRC ci sono numerose mutazioni inattivanti geni la cui funzione fisiologica è quella di mantenere la stabilità cromosomiale durante la replicazione, e in generale, queste mutazioni causano instabilità cromosomica nella maggior parte dei tumori [239]. Diversamente da altri cancro, il CRC non prevede l'amplificazione del numero di copie geniche [240] o riarrangiamenti genici (Fig.48 e Fig.49).

In un sottogruppo di pazienti affetti da CRC è stata trovata **l'inattivazione di geni coinvolti nel mismatch repair**.

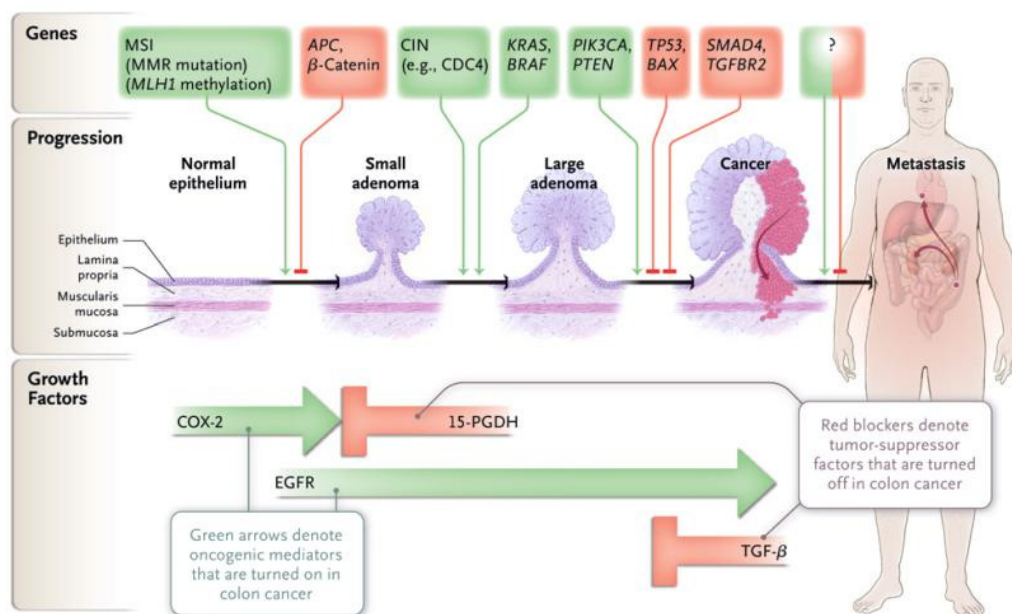


Figura 48 Geni e fattori di crescita che guidano la progressione del tumore colon-rettale

L'inattivazione può essere ereditata, come nel tumore del colon ereditario non poliposico (HNPCC), anche conosciuto come sindrome di Lynch, o acquisita, come nel caso del silenziamento indotto dalla metilazione di geni codificanti per il mismatch repair (Fig.48 e Fig.49) [235].

Il silenziamento epigenetico dei geni, principalmente dovuto ad un' **alterata metilazione** del DNA, è un altro meccanismo di inattivazione genica in pazienti affetti da tumore del colon-retto, come nel caso di MLH1 (Fig.48 e Fig.49) [235,241,242,243].

7.5.2 Inattivazioni Mutazionali di Geni Oncosoppressori

Il carcinoma del colon retto è contraddistinto da molti cambiamenti a livello genico ma alcuni fattori sicuramente basilari per la formazione del tumore sono le alterazioni di importanti pathway di signaling [244].

Fra questi, è da ricordare l'attivazione della via di Wnt, considerata l'evento iniziale della cancerogenesi del colon-retto. Il segnale

di Wnt viene attivato quando l'oncoproteina β -catenina si lega a fattori nucleari per creare un fattore di trascrizione che regola geni implicati nell'attivazione cellulare. Il complesso di degradazione della β -catenina controlla i livelli della suddetta proteina tramite la proteolisi. Un componente di questo complesso, APC (adenomatous polyposis coli), non solo degrada la β -catenina ma inibisce anche la sua localizzazione a livello nucleare [244].

La mutazione più comune nel tumore del colon-retto, primo step della cancerogenesi del CRC, è l'inattivazione del gene che codifica per la proteina **APC**. In assenza di quest'ultima, viene a mancare il controllo dei livelli della β -catenina, così il signaling di Wnt è appropriatamente e costitutivamente attivato. Mutazioni germinali di APC danno origine alla poliposi adenomatosa familiare; nei soggetti portatori di questa mutazione possono svilupparsi più di 100 polipi adenomatosi, così il rischio di sviluppare il tumore dopo i 40 anni è praticamente del 100%[236,244,245]. Mutazioni somatiche e delezioni che inattivano entrambe le copie di APC sono presenti nella maggior parte degli adenomi colon-rettali [236,245]. In un piccolo sottogruppo di tumori con APC wild-type, le mutazioni della β -catenina rende la proteina resistente al complesso di degradazione, rendendo attivo il signaling di Wnt [236,245, 246]. L'inattivazione del pathway di p53, indotta dalla mutazione di TP53 è il secondo step verso lo sviluppo del tumore del colon-retto. Nella maggior parte dei tumori, i due alleli TP53 sono inattivati attraverso la combinazione di una mutazione missenso, che inattiva l'attività trascrizionale di p53, e una delezione cromosomica che elimina il secondo allele di TP53 [232,235,236,238,247,248].

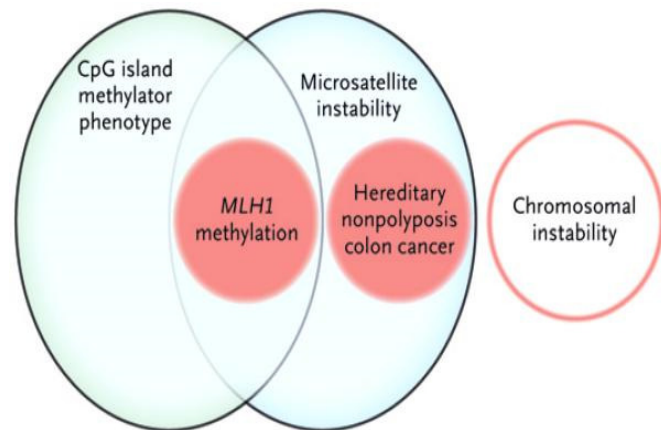


Figura 49 Pathways di instabilità genetica che causano le Neoplasie del Colon

7.5.3 Attivazione di Oncogeni

Diversi oncogeni giocano un ruolo chiave nel promuovere il tumore del colon-retto. Le mutazioni a carico degli oncogeni *RAS* e *BRAF*, che attivano il signaling della mitogen-activated protein kinase (MAPK), accadono rispettivamente nel 37% e nel 13% dei tumori del colon-retto [249,250,251,252,253]. Le mutazioni di *BRAF* sono rilevabili anche nei polipi piccoli, ma sono più comuni nei polipi iperplastici, negli adenomi seghettati, e nei tumori del colon prossimali. I pazienti con numerose e grosse lesioni iperplastiche, detta sindrome da poliposi iperplastica, hanno un aumento del rischio di sviluppare un tumore del colon-retto [235,252,253].

7.6 Alterazioni dei MicroRNA nel CRC

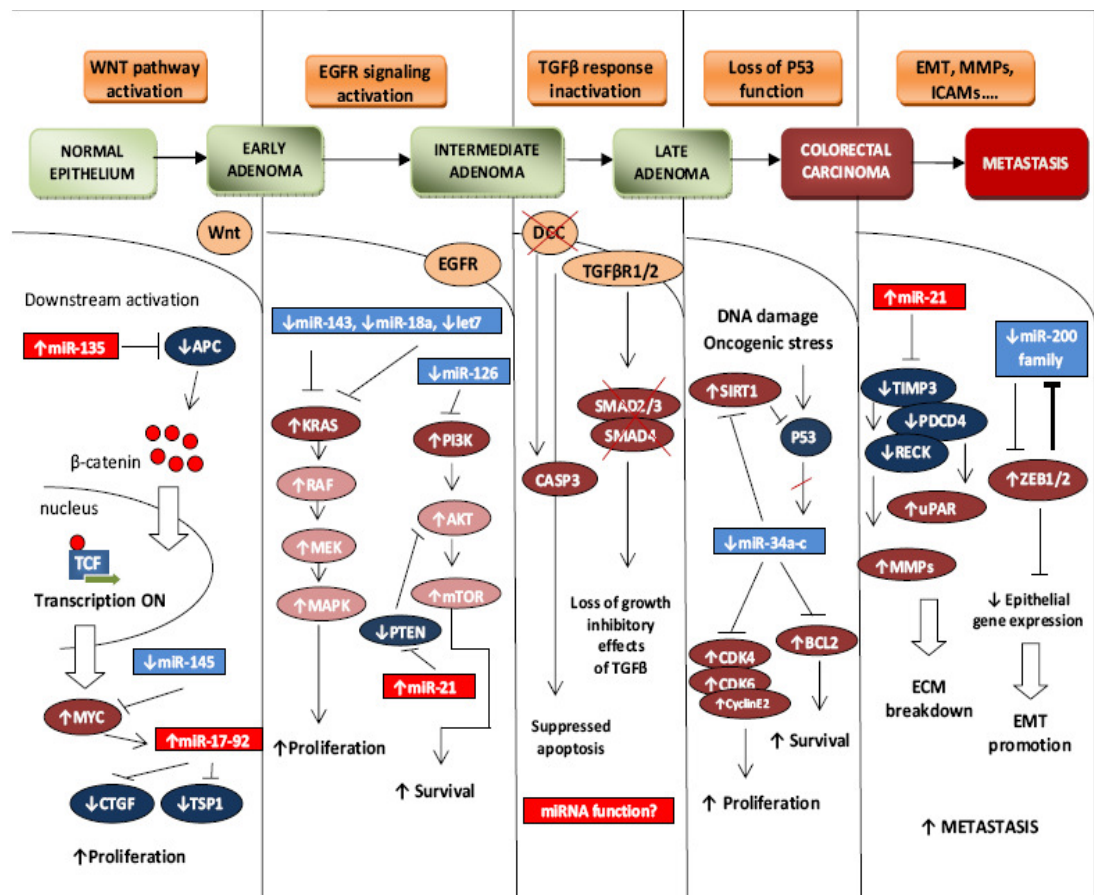


Figura 50 MiRNA coinvolti nella patogenesi del CRC

7.6.1 Alterazione del silenziamento genico mediato dai MiRNA nel CRC

Nel tumore del colon-retto, il silenziamento genico mediato dai miRNA può essere alterato; infatti in un gruppo di pazienti con instabilità dei microsatelli è stato dimostrato che *AGO2* e *TNRC6A* sono mutate e downregolate nel tessuto tumorale [254]. Ago2 è un membro della famiglia argonauta che interagisce con Tnrc6A per legare il target ad mRNA e indurre il silenziamento genico. In contrasto Snd1, un altro componente di RISC, è upregolato nei foci delle cripte aberranti e nel tumore del colon; la transfezione stabile di Snd1 nelle cellule epiteliali intestinali sane causa la perdita dell'inibizione da contatto e la polarità cellulare, insieme con la downregolazione di APC, il principale inibitore del signaling di Wnt/catenina oncogenico (Fig. 50) [255].

7.6.2 Alterazione della proliferazione cellulare mediata dai MiRNA nel CRC

La proliferazione cellulare incontrollata è una delle più comuni caratteristiche dei tumori; un certo numero di miRNA sono stati trovati alterati durante la proliferazione cellulare nel CRC. L'attivazione della cascata Ras/Raf/Mek/Erk promuove la proliferazione cellulare nell'epitelio del colon [256]; infatti, le mutazioni di KRAS sono state riportate nel 30-60% di CRC [257,258].

Diversi miRNA inibiscono la proliferazione cellulare nel CRC attraverso il targeting di KRAS; per esempio, culture cellulari di colon transfettate con let-7a, miRNA frequentemente downregolato nel CRC, causa un'inibizione della crescita cellulare e la downregolazione della proteina RAS [259,260,261]. Il miR-143 è un altro miRNA che ha come target KRAS [261,262,263,264,265,266,267,268], ed è stato osservato nei tessuti di tumore del colon una correlazione inversa tra la proteina KRAS e l'espressione del miR-143. Le cellule Lovo trattate con antagonisti del miR-143 hanno un incremento della proliferazione, mentre l'overespressione del miR-143 ha l'effetto opposto [231], riducendo anche la capacità delle cellule tumorali di colon di formare colonie in soft agar; oltre a KRAS, sono stati identificati come diretti target del miR-143, anche ERK5 e DNMT3A (Tab. 17) [268,269]. Anche il miR-18*a ha come target KRAS; la repressione del miR18*a causa un aumento della proliferazione cellulare, promuovendo la crescita ancoraggio-dipendente delle HT29 in soft agar [270]. Al contrario, il miR-200b, upregolato dal 5-fluorouracile, attiva indirettamente KRAS reprimendo PTPN12, suggerendo che questo miRNA possa contrastare gli effetti citotossici del 5-fluorouracile (Tab.15) [271]. Un altro miRNA la cui espressione risulta ridotta in un gruppo di tumori del colon è il miR-24, che inibisce la proliferazione cellulare delle cellule di tumore del colon e induce il blocco del ciclo cellulare in fase G₂/S attraverso il diretto targeting di DHFR. Sebbene il miR-24 upregola p53 e p21, la sua azione anti-mitogenica è indipendente dalla funzione di p53 [272]. Diversamente il miR-192 e il miR-215, entrambi hanno come target DHFR, inducono il blocco del ciclo cellulare in G1 e G2 in presenza di p53 attiva [273,274, 275]; sia il miR-192 che il miR-215 possono essere indotti da p53 [273], indicando che questi due miRNA partecipano ad un feedback positivo per mediare gli effetti oncosoppressori di p53. L'incremento dell'espressione del miR-215 può contribuire a rallentare il rate di proliferazione e chemioresistenza nelle cellule CD133⁺HI/CD44⁺HI [276]. Sia il miR-34a che il miR-675 alterano la proliferazione cellulare nel tumore del colon attraverso la diretta o indiretta regolazione dei fattori trascrizionali della famiglia di E2F. L'espressione del miR-34a è ridotta nel tessuto tumorale di colon primario[277], ed è indotta anche dall'attivazione di p53 [278]. Nelle cellule tumorali di colon, il miR-34a si lega a E2F1/3 per indurre la senescenza cellulare; inoltre, il miR-34a rallenta la progressione del ciclo cellulare attraverso l'induzione di p21 in

maniera p53 dipendente [277]; è stata inoltre osservata la metilazione delle isole CpG del suo promotore in alcune linee cellulari di colon [279]. Il miR-675 risulta essere upregolato nel tumore del colon, ed è stato dimostrato che il suo target, che codifica per la proteina retinoblastoma (pRB), promuove la proliferazione cellulare del tumore del colon e la formazione di colonie su soft agar [280].

Invece il miR-145 è costantemente downregolato nell'adenocarcinoma e negli stadi cancerosi di tumore colon-rettale [263,266,267]; un target del miR-145 è IRS1 che media il segnale oncogenico trasdotto da insulin-like growth factor I receptor [281,282], la cui stimolazione attiva Ras/Raf/Mek/Erk e la cascata di PI3K/Akt per promuovere la proliferazione cellulare e la sopravvivenza [283]. Altri target del miR-145 sono YES, una tirosin-chinasi correlata a Src, la cui attività è upregolata nel CRC, e FLI1, un gene coinvolto nella traslocazione cromosomiale t(11;22)(q24;q12) nel sarcoma di Ewing [284,285]. Tra i target del miR-145 ci sono FSCN1, ADAM17, BIRC2, VANG1 e STAT1 (Fig. 50 e Tab. 17) [284].

7.6.3 Alterazione dei meccanismi apoptotici mediati dai MiRNA nel CRC

Nel tumore del colon-retto è stata osservata l'alterazione dell'espressione dei miRNA che regolano l'apoptosi alterando l'espressione dei membri della famiglia di Bcl2 (proteina anti-apoptotica); uno di questi è il miR-195, downregolato nei tessuti tumorali di colon, capace di indurre l'apoptosi nelle linee cellulari di colon HT29 e LoVo [286]. Il miR-143 è un altro miRNA frequentemente downregolato nel tumore del colon, riduce la vitalità delle cellule tumorali e incrementa la morte cellulare dopo il trattamento con 5-fluorouracile associato alla downregolazione di Bcl2 [269]. Nelle cellule tumorali di colon è stato osservato che il miR-491 induce apoptosi attraverso il targeting di Bcl-xL, tuttavia non è chiaro se l'espressione del miR-491 è alterata nel CRC [287]. Il miR-133 è marcatamente downregolato nel tessuto tumorale di colon e nelle linee cellulari; la sua overespressione invece induce apoptosi nelle cellule tumorali di colon attraverso il targeting di c-Met, recettore per il fattore di crescita degli epatociti (HGF) [288]. Altri miRNA, come il miR-145, il miR26, il miR107, il miR-210 e il miR-342 sono coinvolti nella modulazione della risposta apoptotica nel CRC (Fig. 50 e Tab. 17) [291].

Deregulated expression of miRNAs in CRC tissues compared with normal tissues

Up-regulated in CRC	Down-regulated in CRC
miR-15b	miR-9
miR-17-3p	miR-30-3p
miR-17-5p	miR-101
miR-18a	miR-122
miR-19a	miR-124a
miR-20a	miR-126
miR-21	miR-129
miR-31	miR-133b
miR-92	miR-137
miR-96	miR-143
miR-133b	miR-145
miR-135b	miR-328
miR-181b	miR-451
miR-183	
miR-191	
miR-200c	

Tabella 17 miRNA alterati nei tessuti CRC rispetto ai tessuti sani

7.6.4 Invasività e Metastasi mediate dai MiRNA nel CRC

Diversi miRNA regolano l'invasività e le metastasi nelle cellule tumorali di colon. Per esempio, il miR-196 promuove il distacco delle cellule tumorali, la migrazione e l'invasione attraverso il diretto targeting di una classe di fattori trascrizionali conosciuti come homeobox [292]. Infatti, il miR-196a si lega al 3'UTR di HoxA7, HoxB8, HoxC8 e HoxD8 e downregola la loro espressione. La downregolazione di queste proteine homeobox è associata ad un incremento dei livelli di fosforilazione di Akt; il miR-196a promuove anche lo sviluppo di metastasi polmonari nel topo dopo aver iniettato nella vena della coda le cellule tumorali di colon [292]. Oltre al miR-196a, il miR-21 e il miR-141 promuovono la motilità o l'invasività delle cellule tumorali di colon [293,294]; il miR-21 ha come target PDCD4, che è un oncosoppressore frequentemente poco espresso nei tumori solidi ed è associato con la progressione della malattia e la metastatizzazione, mentre il miR-141 downregola SIP1, repressore trascrizionale dell'E-caderina che inibisce la transizione epiteliale-mesenchimale (Tab. 17 e 18) [293,294]. Altri miRNA coinvolti nel controllo dell'invasività e delle metastasi nel CRC sono il miR-26, il miR-145 e il miR-200c (Fig 50 e Tab. 17 e 18) [295,291,296].

miRNAs associated with advanced TNM stage and shorter survival in CRC

Advanced TNM stage	Up-regulated	miR-9 miR-21	miR-31 miR-129
Shorter survival	Up-regulated	miR-200c	miR-21
	Down-regulated	miR-320	miR-498

Tabella 18 miRNA associati allo stadio e alla sopravvivenza nel CRC

7.6.5 MiRNA capaci di regolare il fenotipo del CRC

I miRNA, oltre alla proliferazione cellulare, all'apoptosi, e alla metastatizzazione, possono regolare anche il fenotipo del tumore, ad esempio modulando la sensibilità ai farmaci. A questo proposito, il miR-143 sensibilizza le cellule tumorali di colon all'apoptosi indotta dal 5-fluorouracile, mentre il miR-192 e il miR-215 hanno l'effetto opposto [269,297]; il miR-125 riduce anche la sensibilità delle cellule tumorali di colon al metotrexato e al Tomudex (un inibitore della timidilato sintetasi) [276]. Ci sono anche miRNA direttamente coinvolti nel mantenimento dell'integrità genetica, come il miR-155 che promuove mutazioni attraverso il targeting di 3 enzimi coinvolti nella riparazione del DNA, hMSH2, hMSH6, e hMSH1 [298]. Il miR-21 e il miR-181b-1, entrambi indotti dall'attivazione di STAT3, sono collegati all'infiammazione nella sede del tessuto tumorale di colon primario, attraverso il targeting di PTEN e CYLD [299].

7.7 MiRNA come markers di suscettibilità nel CRC

Predire il rischio di malattia in base alla sequenza genetica di un individuo è il principale obiettivo per creare una medicina personalizzata. Sono stati fatti grossi sforzi per identificare i polimorfismi associati al CRC [233]. Come detto precedentemente, i miRNA esercitano la loro funzione cellulare legandosi al 3'UTR del suo target ad mRNA; quindi varianti di sequenza nel sito di legame per il miRNA o SNP a carico dei geni codificanti per i miRNA alterano l'interazione tra il miRNA e il suo target, alterando anche la funzione oncogenica o oncosoppressiva del miRNA associato al cancro [233]. Quindi, polimorfismi dei geni CD86 e INSR a carico dei loro siti di legame dei miRNA sono associati con un aumento del rischio di insorgenza del tumore del colon, con un odd ratio per le varianti in omozigosi rispettivamente di 2.74 e di 1.94 (Fig. 53) [211].

7.8 MiRNA come markers diagnostico nel CRC

I miRNA sono promettenti nuovi biomarkers per la diagnosi del tumore del CRC. Le cellule sane e quelle tumorali rilasciano miRNA nel sangue periferico; i miRNA circolanti sono contenuti in complessi altamente stabili, conosciuti come esosomi o microvescicole, protetti dalla degradazione delle RNase [300,301]. Nei pazienti affetti da CRC, è stato dimostrato che i livelli plasmatici sia del miR-17-3p che del miR-92a sono significativamente più elevati tra i 95 miRNA analizzati [302]. I livelli circolanti del miR-17-3p e del miR-92a si sono significativamente ridotti dopo la rimozione chirurgica del tessuto tumorale; inoltre il miR-92a può discriminare il CRC da altre condizioni patologiche, come il tumore gastrico e malattie infiammatorie dell'intestino, con una sensibilità del 89% e una specificità del 70%. Il valore diagnostico del miR-92a è corroborato dalle scoperte del gruppo di Huang et al, i quali hanno dimostrato che il miR-92a insieme con il miR-29a, possono discriminare tumori colon-rettali e gli adenomi in stadio avanzato dai controlli, supportando che il miR-92a è adatto per la diagnosi precoce del CRC [303]. Oltre al sangue periferico, le feci rappresentano un'altra fonte preziosa per la rilevazione di miRNA specifici per il CRC, poichè i colonociti sono costantemente esfoliati dal tratto intestinale; per questo, gli alti livelli fecali del miR-21 e del miR-106 sono stati rilevati in pazienti con adenomi e CRC confrontati con individui non affetti da CRC (Fig. 51, 52 e 53) [304].

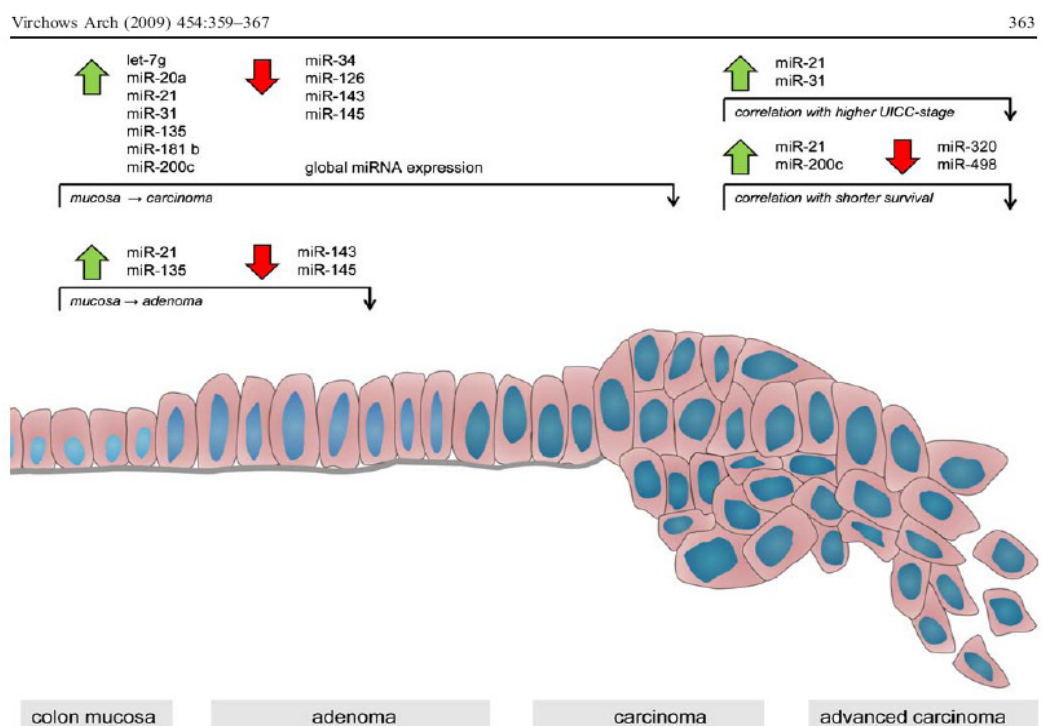


Figura 51 Cambiamenti dell'espressione dei miRNA nell'adenoma colon-rettale, nel carcinoma, e la loro correlazione con lo stadio UICC o con la sopravvivenza

7.9 MiRNA come markers prognostico nel CRC

Diversi studi hanno analizzato l'associazione tra l'alterazione dei miRNA e l'esito della malattia nei pazienti affetti da tumore del colon-retto; uno di questi è il miR-21, la cui overespressione è associata con la positività dei linfonodi, lo sviluppo di metastasi distanti e con l'avanzamento della stadiazione TNM [305,264]; l'overespressione del miR-21 è anche associata con la mortalità tumore-specifica indipendente dalla stadiazione TNM [305,306]. Secondo la letteratura, oltre al miR-21, altri miRNA sono associati alle dimensioni del tumore, alle metastasi e/o alla sopravvivenza dei pazienti; per esempio, le basse espressioni del miR-152 e del miR-148a sono correlate con una maggiore dimensione del tumore e uno stadio pT più avanzato [307]; tumori maggiori di 50 mm di diametro hanno anche una più bassa espressione del miR-143 e miR-145, entrambi con funzione oncosoppressiva [262]. Tuttavia, nei pazienti con un'alta espressione del miR-143 è stato osservato un intervallo di assenza da malattia più breve [264]. Il miR-31 è positivamente correlato ad una invasione più profonda del tumore e ad uno stadio più avanzato TNM [265]. Sia il miR-129* che il miR-137 sono differenzialmente espressi nei pazienti con tumore del colon con metastasi linfonodali confrontati con quelli con linfonodi privi di metastasi [308]. La downregolazione del miR-106a è associata con un ridotto intervallo di assenza da malattia e di sopravvivenza; mentre i pazienti con un'overespressione del miR-200c hanno un periodo di sopravvivenza minore rispetto ai pazienti con un'espressione più bassa [309,310]. I livelli di espressione del miR-320 e del miR-498 sono correlati anche con la probabilità di sopravvivenza senza recidiva in pazienti affetti da CRC di stadio II [311]. Tuttavia, l'espressione di un pannello di 17 miRNA è associato con l'evento della malattia con un'accuratezza del 81% (Fig. 52, 53) [311].

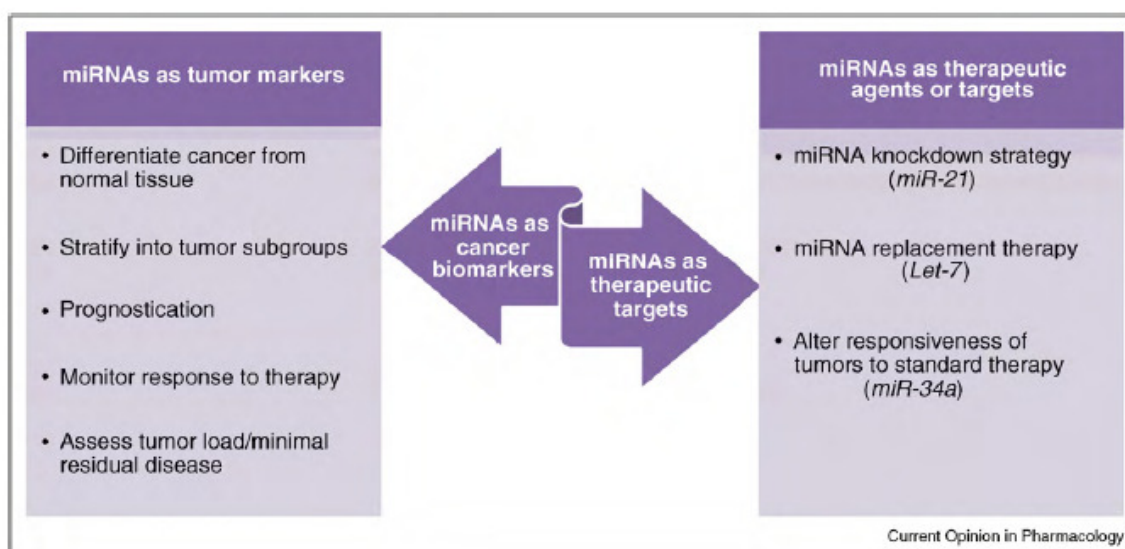


Figura 52 Applicazioni potenziali dei miRNA come biomarcatore, come agente terapeutico e target per il tumore

7.10 MiRNA come predittori dell'esito del trattamento nel CRC

L'alterata espressione dei miRNA o i polimorfismi nei geni dei miRNA o i polimorfismi nei siti che legano i miRNA sono correlati con l'esito del trattamento nei pazienti affetti da CRC. Per esempio, i livelli di espressione di let-7g e del miR-181b sono fortemente associati alla risposta alla chemioterapia con S-1, un' antimetabolita basato sul 5-fluorouracile [312]. Uno SNP nel sito di legame del miRNA let-7 a livello del 3'UTR del gene di KRAS è positivamente correlato alla reattività al cetuximab nei pazienti wild-type per KRAS con CRC metastatici [313,314]. Tuttavia lo SNP rs7372209 e rs1834306 nel pri-miR-26a-1 e nel pri-miR-100, rispettivamente, sono correlati con la risposta al tumore o con il tempo di progressione alla metastatizzazione in pazienti con CRC trattati con 5 fluorouracile e irinotecan (Fig.52, 53) [315].

Molecular Cancer 2009, 8:102

<http://www.molecular-cancer.com/content/8/1/10>

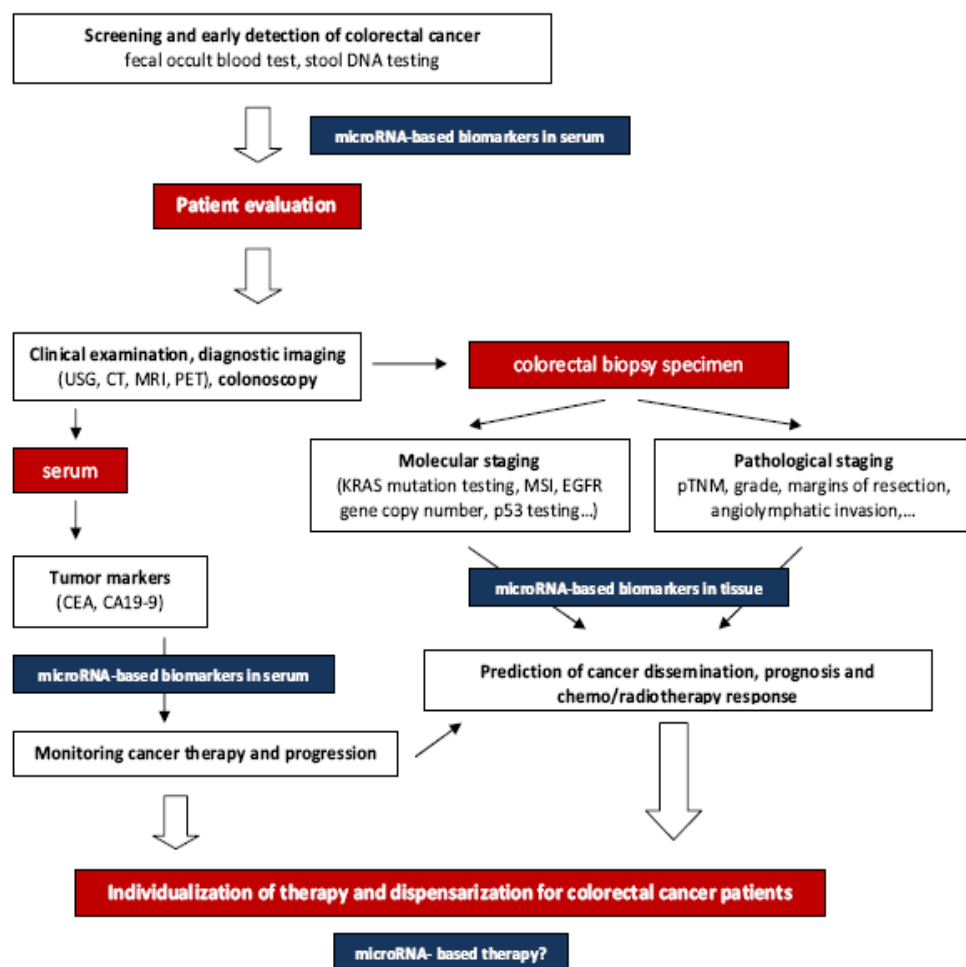


Figura 53 Uso potenziale dei miRNA nel comportamento clinico di pazienti affetti da CRC

8. OBIETTIVO DELLO STUDIO

La carcinogenesi del colon rappresenta una progressione da polipi benigni a adenocarcinomi invasivi con metastasi distali. Si ritiene che questi cambiamenti patologici sono causati dall'alterata attivazione o inattivazione di proteine codificate da proto-oncogeni e da geni oncosoppressori. Tuttavia recenti scoperte sui microRNA hanno modificato le nostre conoscenze sul ruolo dei geni non codificanti per proteine nella carcinogenesi. Infatti un certo numero di miRNA presentano un'espressione diversa nel tessuto tumorale del colon rispetto alla corrispettiva mucosa sana. Questi miRNA alterano la proliferazione cellulare, l'apoptosi e le metastasi attraverso le loro interazioni con il signalling intracellulare. Dal punto di vista delle prospettive cliniche, i polimorfismi all'interno dei geni dei miRNA e all'interno dei siti di legame per i miRNA sono associati con il rischio di sviluppare il tumore del colon; quindi miRNA isolati da feci o sangue possono servire come biomarcatori per una diagnosi precoce. L'alterata espressione di miRNA o polimorfismi nei geni dei miRNA sono stati correlati con la sopravvivenza o con l'esito del trattamento dei pazienti in diversi studi, come visto precedentemente [233].

L'obiettivo del nostro studio è stato quello di valutare il ruolo di 4 varianti polimorfiche a carico di altrettante sequenze codificanti per i miRNA: hsa-mir-146a (rs2910164C-G), hsa-mir-196a2 (rs11614913 C-T), hsa-mir-499 (rs3746444G-A) e hsa-mir-149 (rs2292832 C-T).

Lo studio è stato condotto su un gruppo di 160 pazienti affetti da carcinoma del colon-retto e su un gruppo comparabile per età e sesso di 178 soggetti sani di controllo.

Il nostro lavoro è partito dalla valutazione della distribuzione dei diversi genotipi nei due gruppi per indagare se vi potessero essere differenze significative fra il genotipo dei soggetti di controllo e quelli dei pazienti affetti da cancro del colon-retto e se questi risultassero in equilibrio con la legge di Hardy-Weinberg. L'identificazione dei genotipi è stata effettuata tramite l'utilizzo di una tecnica rapida e sensibile chiamata High Resolution Melting Analysis (HRMA). Questa tecnica permette di identificare variazioni di singoli nucleotidi, attraverso la valutazione dello shift nella curva di dissociazione di un prodotto di amplificazione, causata dalla sostituzione nucleotidica, attraverso emissione di un'intercalante fluorescente del DNAs. La seconda parte del nostro studio si è focalizzata sulla valutazione del livello di espressione di questi 4 miRNA.

Il principale obiettivo è stato quello di andare a valutare se vi potessero essere delle differenze statisticamente significative fra l'espressione dei miRNA nel tessuto tumorale e la corrispettiva controparte sana.

Inoltre abbiamo valutato l'espressione dei quattro miRNA rispetto al genotipo del tessuto tumorale e alla corrispettiva mucosa sana dei pazienti affetti da cancro del colon-retto sia rispetto alla presenza di un genotipo specifico.

9. MATERIALI E METODI

9.1 Campioni

Per questo studio sono stati reclutati 160 pazienti di età compresa fra i 43 e gli 89 anni, che sono stati sottoposti a resezione chirurgica per carcinoma colon-rettale. Da tutti i pazienti è stato ottenuto il consenso informato.

Il tipo istologico e il grado di differenziazione sono stati valutati secondo i criteri stabiliti dall'organizzazione mondiale della sanità (WHO) [221] e secondo la classificazione TNM [222].

Nella tabella 19 sono riportate le caratteristiche cliniche dei pazienti oggetto di studio.

ETA'	Range: 39-89 Mediana: 69
SESSO	
Maschi	87
Femmine	73
STADIO	
Duke's 1	20
Duke's 2	74
Duke's 3	53
Duke's 4	13
LOCALIZZAZIONE	
Colon destro, ceco, ascendente	59
Colon trasverso, retto, sigma, discendente	101
G1	20
G2	124
G3	16

Tabella 19 Caratteristiche Cliniche dei pazienti oggetto di studio.

I campioni provenienti dai pazienti affetti da tumore al colon-retto e i corrispettivi tessuti sani, sono stati messi in una provetta contenente RNA-later (QIAGEN) e tenuti a 4° C per 24 ore e successivamente a -80°C. Le mucose sane sono state ottenute prelevando il tessuto a circa 5 centimetri di distanza dal tessuto tumorale.

Allo scopo di verificare la distribuzione allelica dei genotipi dei geni codificanti per i quattro miRNA valutati in questo studio sono stati raccolti 178 campioni di sangue provenienti da soggetti sani di controllo.

9.2 Estrazione del DNA e Genotipizzazione

I tessuti provenienti dai pazienti affetti da tumore al colon-retto sono stati omogeneizzati usando Stainless Steel Beads 5mm (QIAGEN, Milano, Italia) e Tissue Lyser (QIAGEN, Milano, Italia). Successivamente sia dai tessuti tumorali che dalla corrispondente controparte sana, sia dal sangue proveniente dai soggetti utilizzati come controllo sano è stato estratto il DNA utilizzando il QIAamp DNA mini Kit (QIAGEN) con l'ausilio del QIAcubeTM (QIAGEN).

Le concentrazioni del DNA estratto sono state determinate tramite l'utilizzo di Nanodrop[®] ND-1000 Spectrophotometer.

I campioni sono stati sottoposti ad un'analisi di HRM per determinare il genotipo degli SNP nei quattro geni codificanti per i miRNA oggetto del nostro studio. Pertanto, sono stati analizzati i seguenti polimorfismi:

- hsa-miR-146a (rs29101164 C>G)
- hsa-miR-149 (rs2292832 T>C)
- hsa-miR-196a2 (rs11614913 C>T)
- hsa-miR-499 (rs3746444 G>A)

La reazione di amplificazione e l'analisi di HRM dei campioni è stata eseguita con lo stesso protocollo, con le stesse condizioni di amplificazione e con gli stessi strumenti visti precedentemente nel paragrafo 4.3. I risultati dell'HRMA sono stati confermati mediante sequenziamento diretto, secondo il protocollo descritto nel paragrafo 4.4. Per determinare le frequenze genotipiche in base al principio di Hardy-Weinberg, abbiamo utilizzato il programma HW Calculator.

9.3 Estrazione dei MiRNA e analisi dell'Espressione

Come descritto precedentemente nello studio sui pazienti affetti da NSCLC, dal tessuto tumorale e dalla corrispettiva mucosa sana proveniente da pazienti affetti da tumore del colon-retto sono stati estratti i miRNA utilizzando il mirVanaTM miRNA Isolation Kit (Ambion, Austin, TX, USA), seguendo le indicazioni del protocollo.

Le concentrazioni dei miRNA estratti sono state determinate utilizzando il Nanodrop[®] ND-1000 Spectrophotometer.

I miRNA estratti sono stati sottoposti ad un protocollo di trascrizione inversa (RT), seguita da una real-time PCR quantitativa per valutare il livello di espressione dei miRNA del nostro studio. Per fare questo sono stati utilizzati primer specifici per la retrotrascrizione e Taqman assay per la real-time PCR (TaqMan MiRNA Assay, Applied Biosystems):

miR-146 (ID 000468)

miR-149 (ID 000472)

miR-196 (ID 000495)

miR-499 (ID 001045)

Il protocollo, le condizioni di amplificazione e gli strumenti usati per eseguire la retrotrascrizione (RT), così come per la real-time PCR quantitativa sono gli stessi visti precedentemente nel paragrafo 4.5.1 e 4.5.2

La quantificazione dei miRNA è stata ottenuta mediante una quantificazione relativa, rapportando la quantità del gene di ogni campione rispetto al gene di riferimento miR-U6B, verso il quale abbiamo normalizzato i dati relativi all'espressione di ciascun gene miRNA tramite l'applicazione della formula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [225].

10. RISULTATI

10.1 Distribuzione dei genotipi nei Tessuti CRC e nelle Corrispettive Mucose Sane

Nella tabella 20 è riassunta l'analisi della distribuzione dei genotipi sia nel tessuto tumorale che nei soggetti di controllo.

SNP	GENOTIPO	TESSUTO TUMORALE n (%)	CONTROLLI n (%)	OR	95% CI	p
miR-146a (rs2910164 C-G)	GG	86 (53.8)	100 (56.2)	1.00		
	CG	57 (35.6)	65 (36.5)	1.015	0.64-1.60	0.521
	CC	17 (10.6)	13 (7.3)	0.681	0.31-1.48	0.218
	[G] vs [C]	[229] vs [91]	[265] vs [91]			0.264
miR-149 (rs2292832 C-T)	CC	79 (49.4)	86 (48.3)	1.00		
	TC	58 (36.2)	75 (42.1)	1.176	0.74-1.87	0.285
	TT	23 (14.4)	17 (9.6)	0.628	0.31-1.29	0.138
	[C] vs [T]	[216] vs [104]	[247] vs [109]			0.278
miR-196a2 (rs11614913 C-T)	CC	62 (38.8)	83 (46.6)	1.00		
	CT	86 (53.8)	84 (47.2)	0.721	0.46-1.13	0.092
	TT	12 (7.4)	11 (6.2)	0.587	0.25-1.38	0.156
	[C] vs [T]	[210] vs [110]	[250] vs [106]			0.073
miR-499 (rs3746444 G-A)	AA	93 (58.1)	105 (59.0)	1.00		
	AG	32 (20.0)	56 (31.5)	0.663	0.39-1.11	0.076
	GG	35 (21.9)	17 (9.5)	2.931	1.49-5.77	0.001
	[A] vs [G]	[218] vs [102]	[266] vs [90]			0.010

Tabella 20 Frequenza allelica e genotipo dei miRNA nei pazienti con cancro al colon-retto (n=160) e nei controlli (n=178).

Per il miRNA-499 si osserva una differenza significativa ($p = 0.001$) nella distribuzione dei genotipi fra i tessuti provenienti da pazienti affetti da tumore al colon-retto e i soggetti di controllo.

Il genotipo omozigote GG risulta essere presente in circa il doppio dei pazienti affetti da tumore rispetto ai controlli.

E' stata dimostrata inoltre una differenza statisticamente significativa ($p = 0.01$) fra l'allele A e G fra soggetti di controllo e soggetti affetti da cancro al colon-retto.

Nelle immagini sottostanti è stato rappresentato il genotipo dei miRNA nei pazienti con cancro al colon-retto e nei controlli (Fig.54).

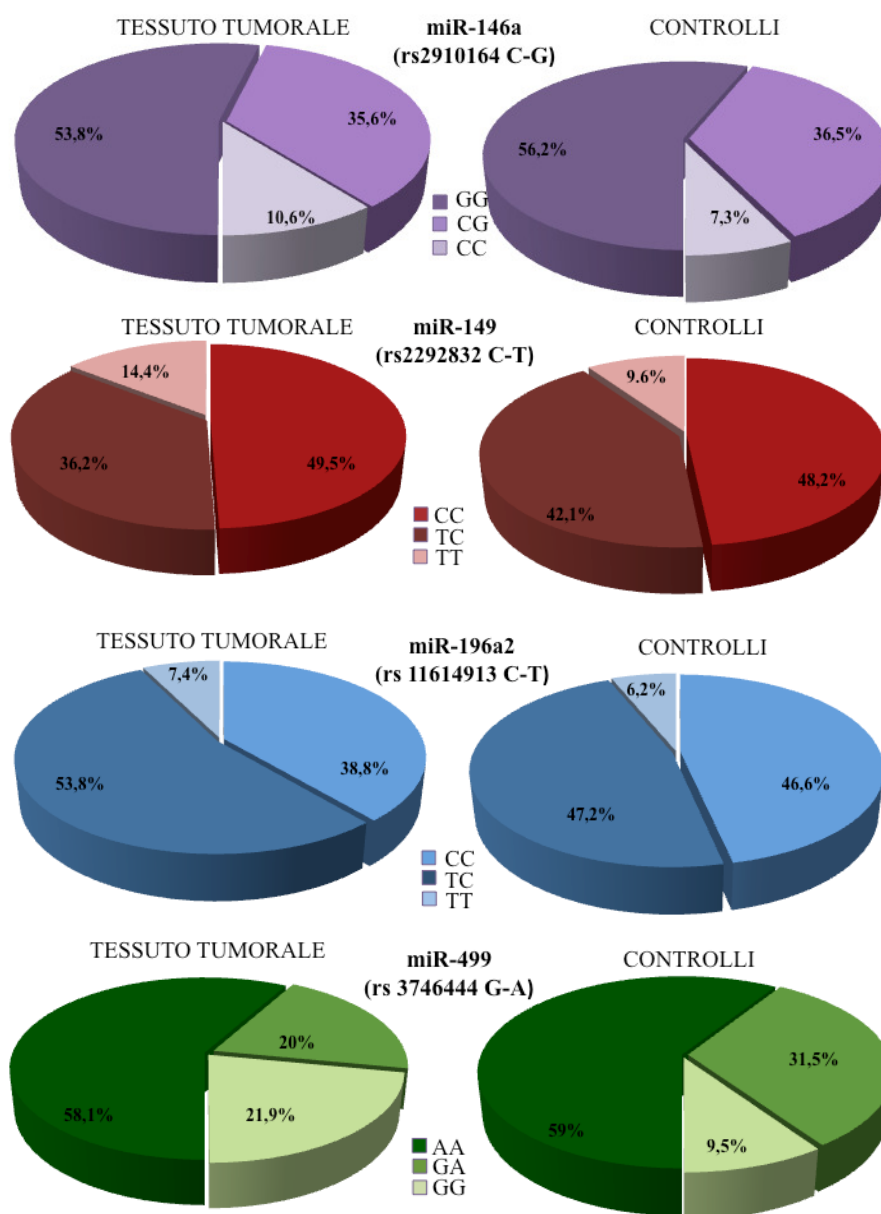


Figura 54 Grafico a torte del genotipo dei miRNA nei pazienti con cancro al colon-retto (n=160) e nei controlli (n=178).

La figura 55 mostra invece la frequenza allelica dei miRNA nei pazienti affetti da carcinoma colon-rettale e nei soggetti di controllo.

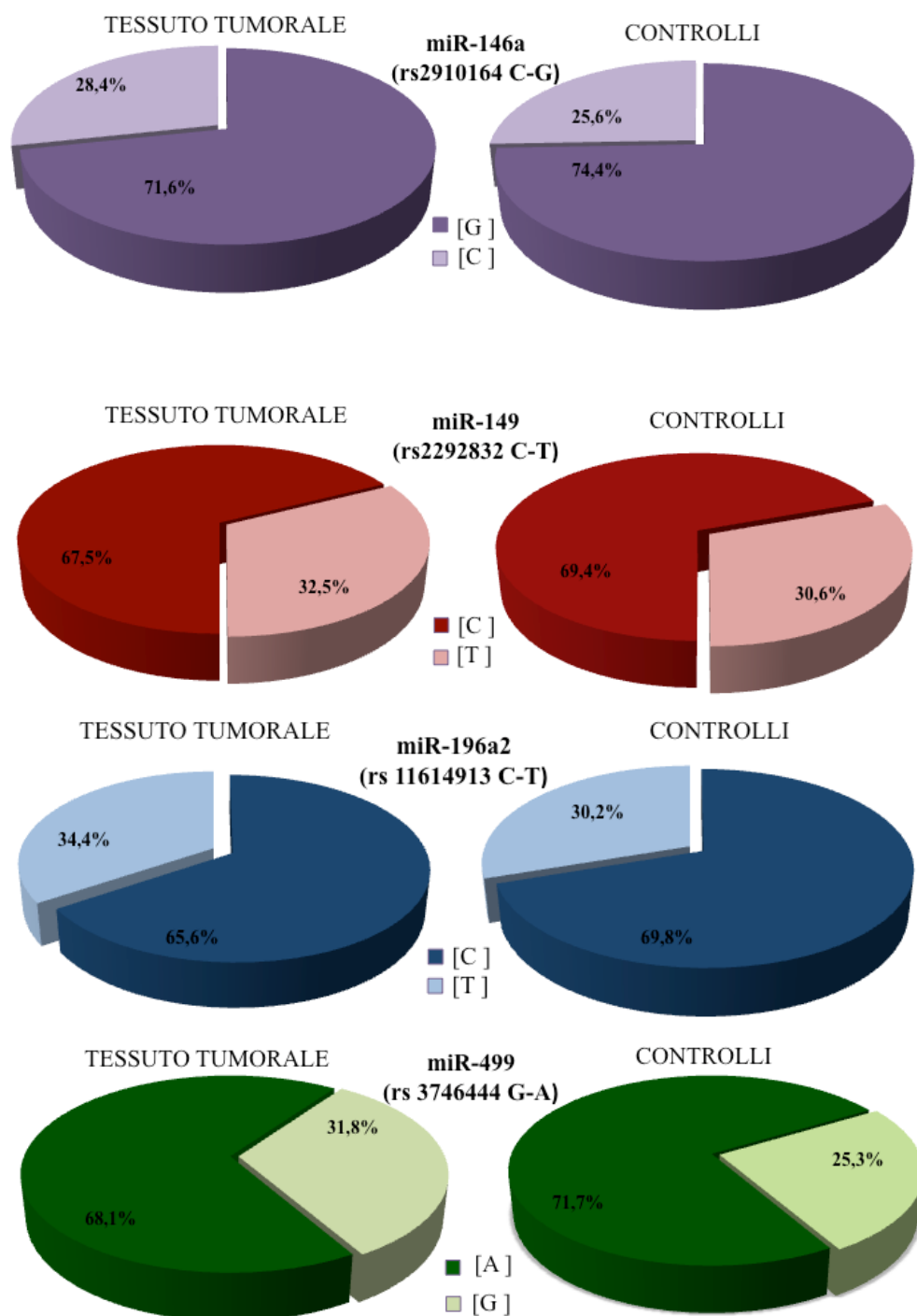


Figura 55. Grafico a torte della frequenza allelica dei miRNA nei pazienti con cancro al colon-retto (n=160) e nei controlli (n=178).

Siamo andati a determinare le frequenze genotipiche in base al principio di Hardy-Weinberg. Dalla tabella 21 si può notare che il genotipo dei 4 miRNA dei soggetti utilizzati come controllo risulta in equilibrio con la legge di Hardy-Weinberg. Da questi risultati si può dedurre inoltre che il genotipo per il miRNA-499 dei pazienti affetti da tumore non segue l'equilibrio di Hardy-Weinberg.

SNP	GENOTIPO	EQUILIBRIO DI HARDY WEINBERG	
		TUMORI	CONTROLLI
miR-146a (rs2910164 C-G)	GG	p= 0.288	p=0.864
	CG		
	CC		
miR-149 (rs2292832 C-T)	CC	p=0.089	p=0.99
	TC		
	TT		
miR-196a2 (rs11614913 C-T)	CC	p= 0.053	p= 0.230
	CT		
	TT		
miR-499 (rs3746444 G-A)	AA	p= 0.000	p=0.82
	AG		
	GG		

Tabella 21 Genotipo dei 4 miRNA ed equilibrio di Hardy Weinberg nei pazienti con carcinoma del colon-retto e nei controlli.

10.2 Espressione dei MiRNA nei Tessuti CRC e nelle Corrispettive Mucose Sane

Successivamente è stato confrontato il livello di espressione dei quattro geni codificanti per i miRNA oggetto del nostro studio nel tessuto tumorale e nella corrispettiva controparte sana dei 160 pazienti affetti da cancro del colon-retto.

Nella tabella 22 sono stati riportati i dati relativi alla mediana e al minimo e massimo relativi all'espressione dei miR-146a, miR-149, miR-196a2 e miR-499. Risulta evidente che l'espressione del miR-499 è più elevata nel tessuto sano rispetto al tessuto tumorale in modo statisticamente significativo ($p = 0.05$).

Per gli altri tre miRNA presi in esame nel nostro studio non è stata riscontrata alcuna differenza significativa.

	miR-146a	miR-149	miR-196a2	miR-499x1000
TESSUTO TUMORALE	73.9 (0.04-10297)	0.32 (0.0001-89.4)	11.72 (0.04-1176)	0.85 (0.01-869.3)
MUCOSA SANA	71.4 (1.1-17559)	1.52 (0.01-388)	8.60 (0.01-1097)	1.48 (0.01-1000)
<i>p</i>	0.295	0.578	0.128	0.05

Tabella 22 Mediana (relativo minimo e massimo) dell'espressione dei miRNA nei pazienti affetti da cancro colon-rettale e nella rispettiva mucosa sana.

Nelle figure 56, 57, 58 e 59 sono riportati i box plot relativi allo studio dell'espressione dei geni codificanti i quattro miRNA.

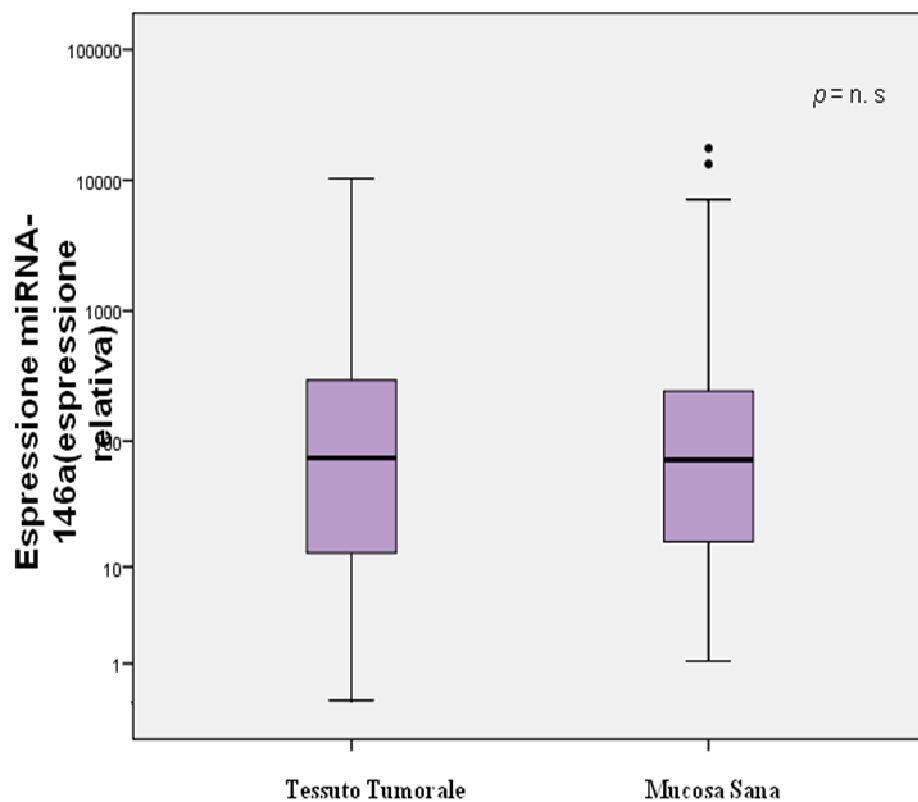


Figura 56. Valutazione dei livelli di espressione del miRNA- 146a nei tessuti tumorali e nelle mucose sane.

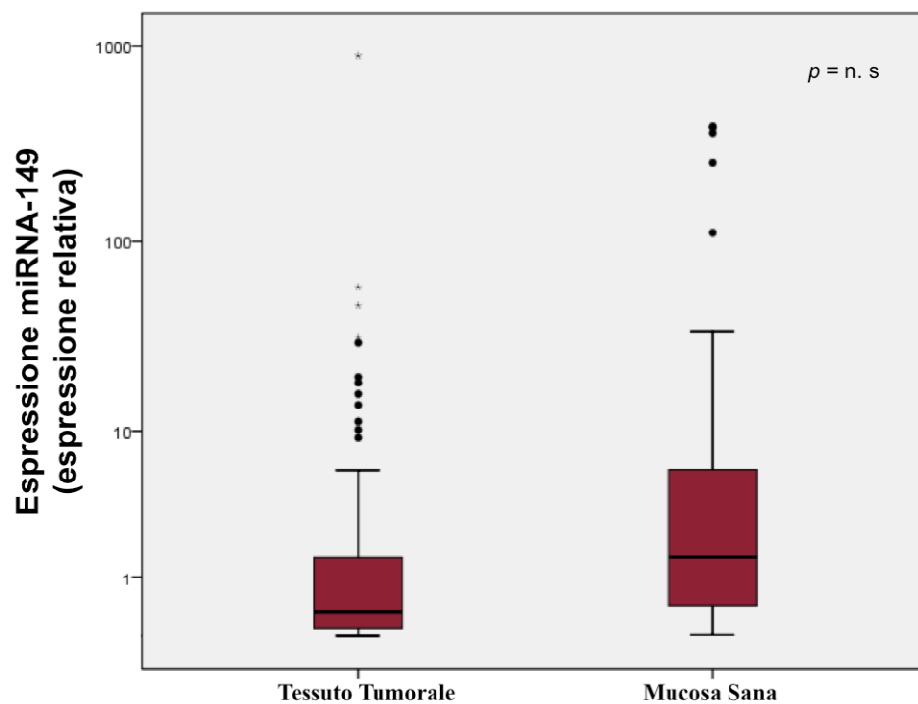


Figura 57. Valutazione dei livelli di espressione del miRNA- 149 nei tessuti tumorali e nelle mucose sane.

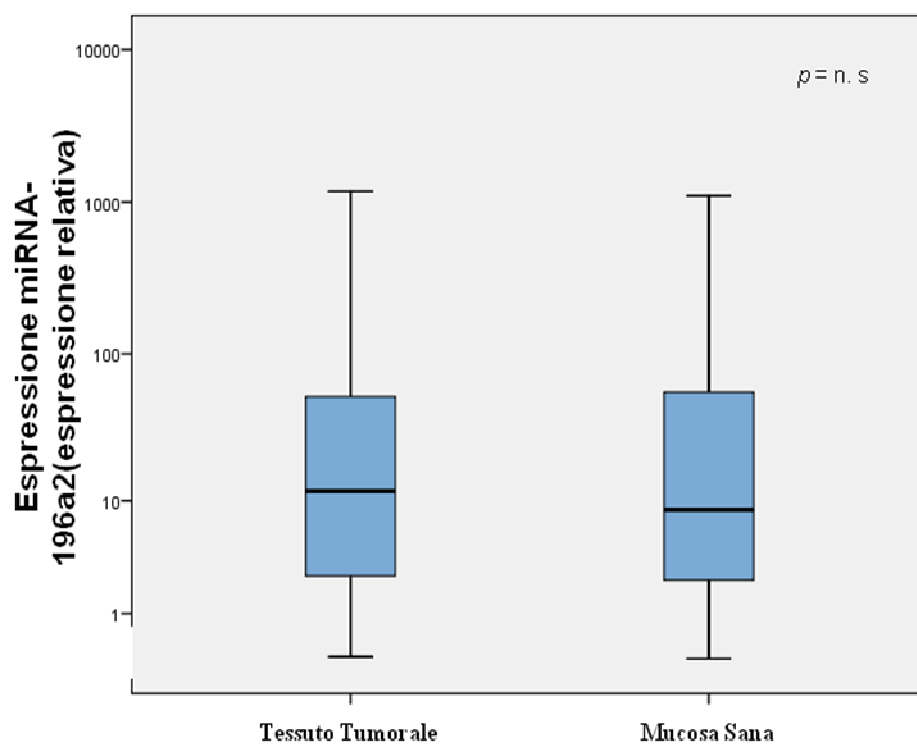


Figura 58. Valutazione dei livelli di espressione del miRNA- 196a2 nei tessuti tumorali e nelle mucose sane.

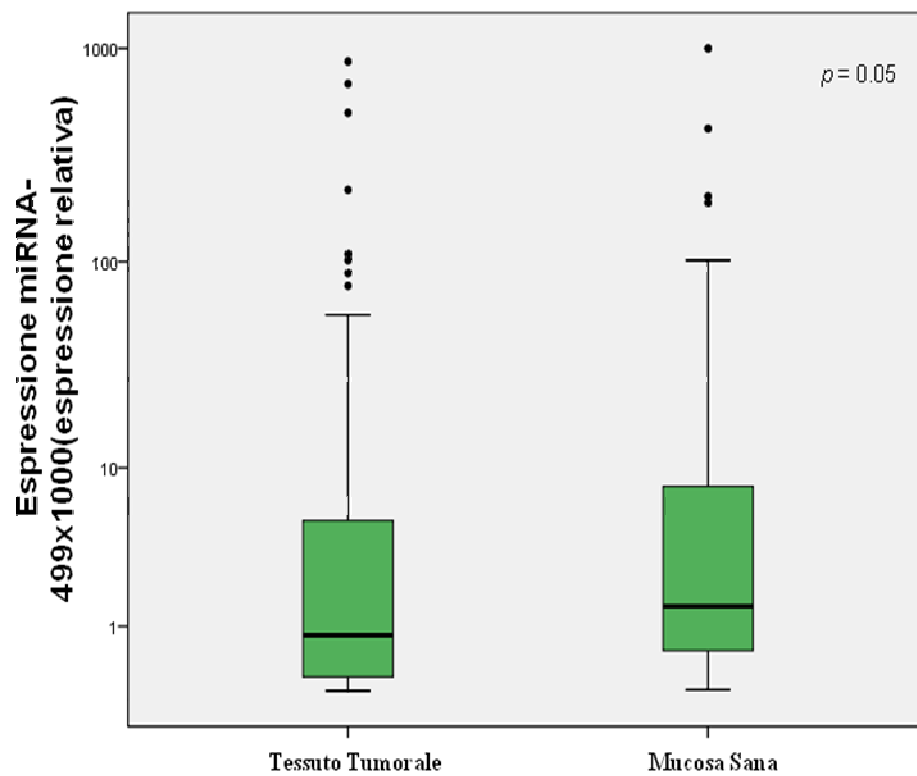


Figura 59. Valutazione dei livelli di espressione del miRNA- 499 nei tessuti tumorali e nelle mucose sane.

10.3 Espressione e Genotipo dei MiRNA nei Tessuti Tumorali e nelle Mucose Sane

E' stato poi valutato il livello di espressione dei quattro miRNA rispetto al genotipo dei geni stessi nel tessuto dei pazienti affetti da tumore e nella loro corrispettiva mucosa sana.

Per tutti e quattro i miRNA presi in esame non sono state riscontrate differenze significative.

Dall'analisi statistica emerge come i diversi genotipi dei 4 miRNA oggetto del nostro studio presentano un ampio range di espressione (Tab. 23-26 e Fig.60-67).

ESPRESSIONE 146a TESSUTO TUMORALE				
GENOTIPO miR- 146a	MEDIANA	MINIMO	MASSIMO	<i>p</i>
GG	78.8	0.6	10297	0.163
CG	56.1	0.04	3565	
CC	32.9	2.3	328.5	

ESPRESSIONE 146a MUCOSA SANA				
GENOTIPO miR-146a	MEDIANA	MINIMO	MASSIMO	<i>p</i>
GG	58.8	2	17560	0.412
CG	125.6	1	3327	
CC	118.5	9	13308	

Tabella 23 Mediana (relativo minimo e massimo) dell'espressione del miR-146a nei tessuti tumorali e nella rispettiva mucosa sana confrontati con il genotipo del rispettivo miRNA

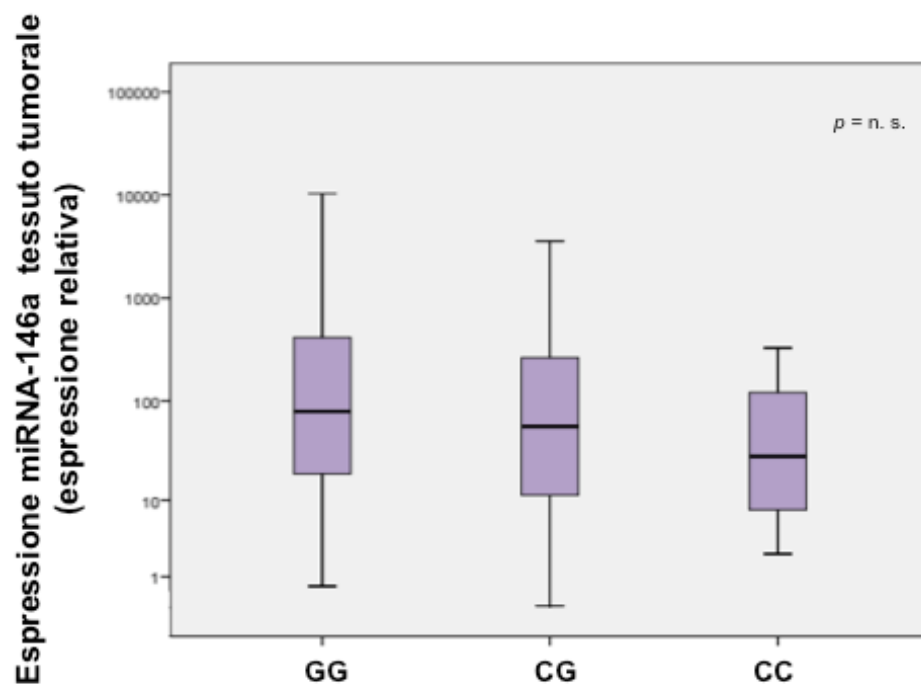


Figura 60. Correlazione fra espressione del miR-146a e genotipo nel tessuto tumorale.

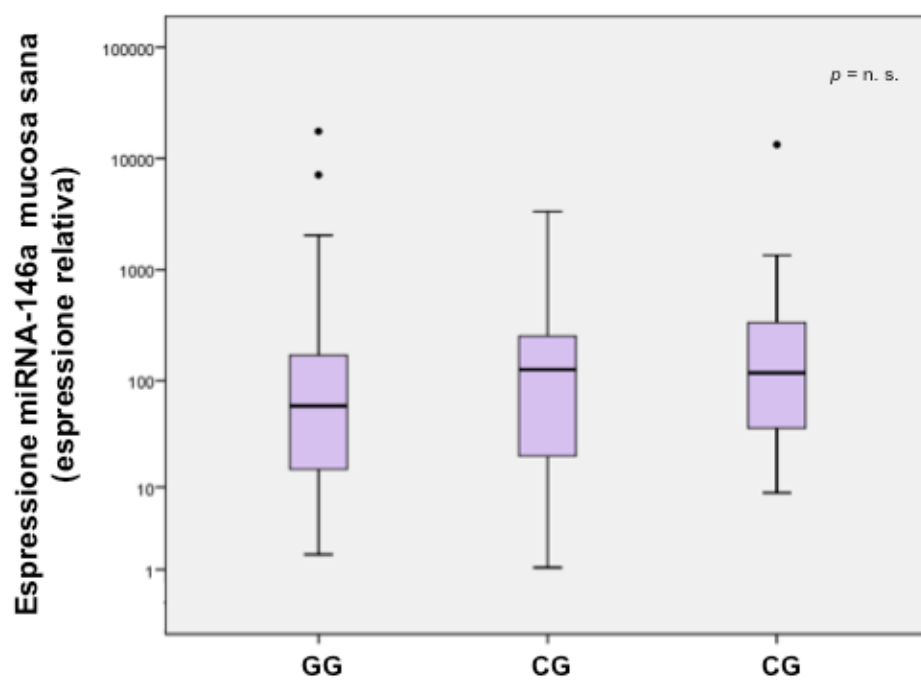


Figura 61. Correlazione fra espressione del miR-146a e genotipo nella mucosa sana.

ESPRESSIONE miR-149 MUCOSA SANA				
GENOTIPO miR-149	MEDIANA	MINIMO	MASSIMO	<i>p</i>
CC	2.5	0.057	388	0.876
CT	1	0.014	388	
TT	0.4	0.011	3.73	

ESPRESSIONE miR-149 TESSUTO TUMORALE				
GENOTIPO miR-149	MEDIANA	MINIMO	MASSIMO	<i>p</i>
CC	0.3	0.0003	891.4	0.133
CT	0.3	0.0001	19.7	
TT	0.6	0.01	4.3	

Tabella 24 Mediana (relativo minimo e massimo) dell'espressione del miR-149 nei tessuti tumorali e nella rispettiva mucosa sana confrontati con il genotipo del rispettivo miRNA.

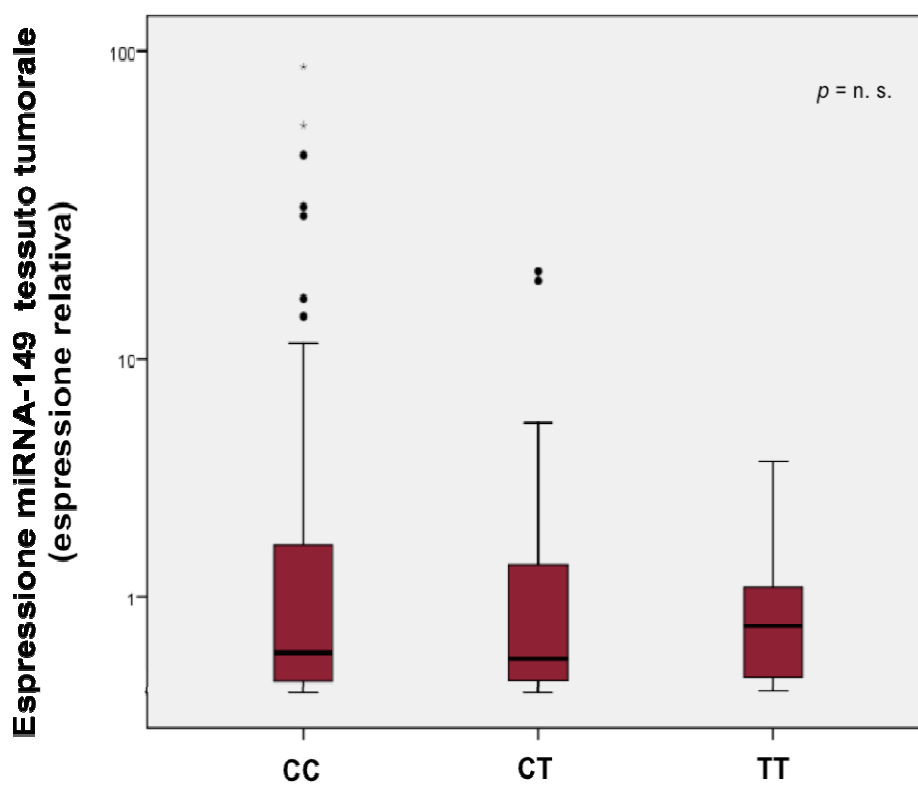


Figura 62. Correlazione fra espressione del miR-149 e genotipo nel tessuto tumorale.

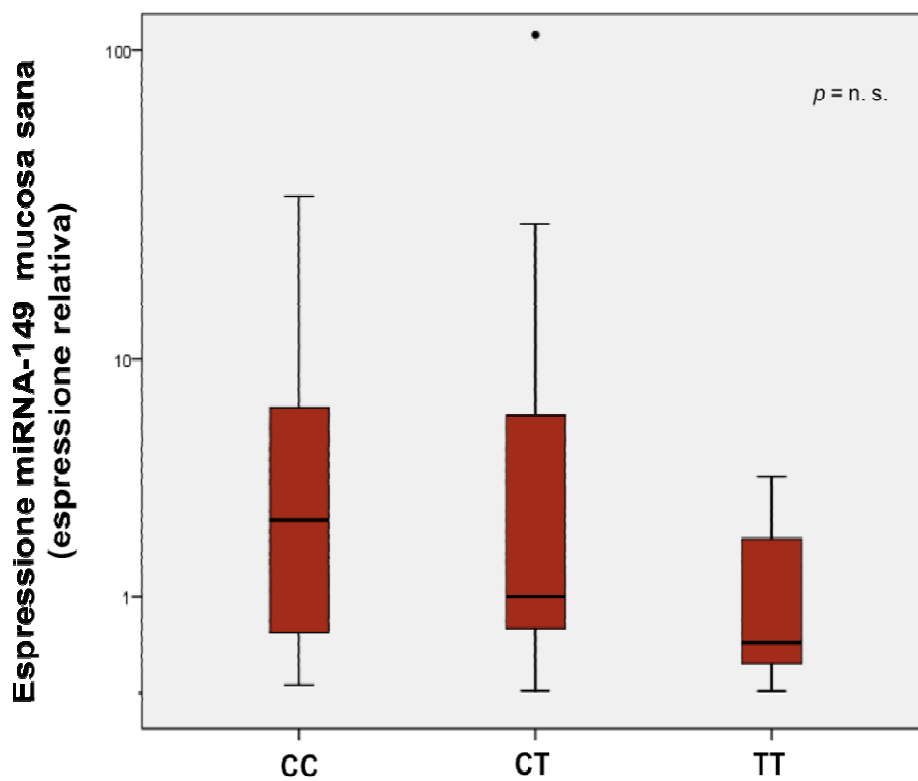


Figura 63. Correlazione fra espressione del miR-149 e genotipo nella mucosa sana.

ESPRESSIONE miR-196a2 TESSUTO TUMORALE				
GENOTIPOmiR-196a2	MEDIANA	MINIMO	MASSIMO	<i>p</i>
CC	18.37	0.07	1003	0.5
CT	9	0.04	1176	
TT	30.1	1.1	1090	

ESPRESSIONE miR-196a2 MUCOSA SANA				
GENOTIPOmiR-196a2	MEDIANA	MINIMO	MASSIMO	<i>p</i>
CC	4.8	0.1	445.7	0.526
CT	11.5	0.01	1097	
TT	14	0.2	445.7	

Tabella 25 Mediana (relativo minimo e massimo) dell'espressione del miR-196a2 nei tessuti tumorali e nella rispettiva mucosa sana confrontati con il genotipo del rispettivo miRNA.

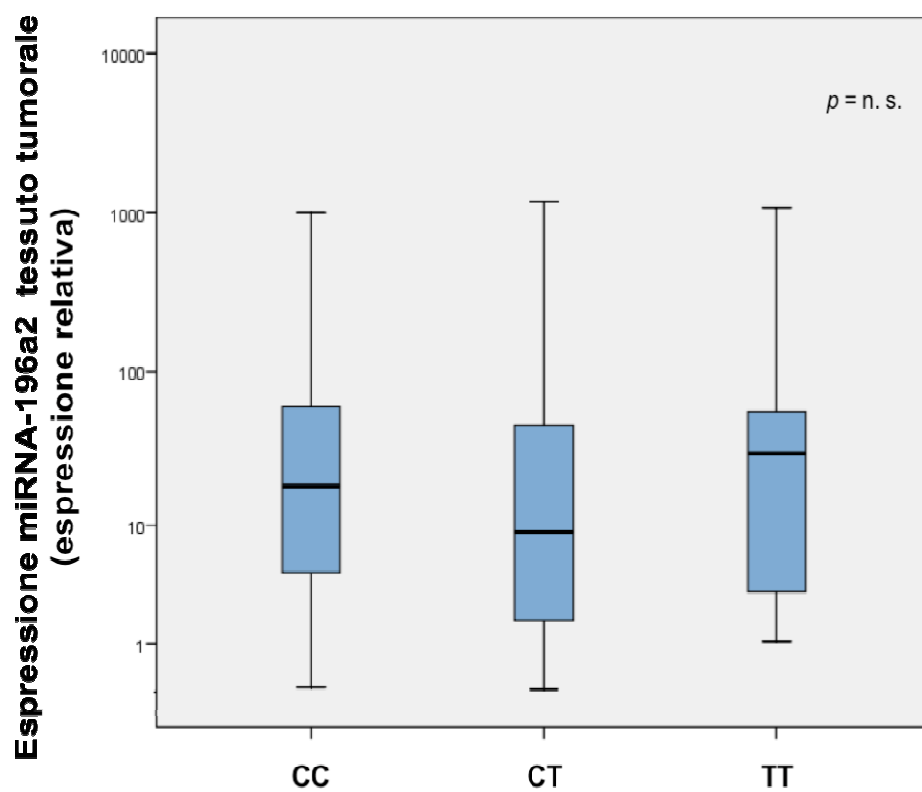


Figura 64 Correlazione fra espressione del miR-196a2 e genotipo nel tessuto tumorale.

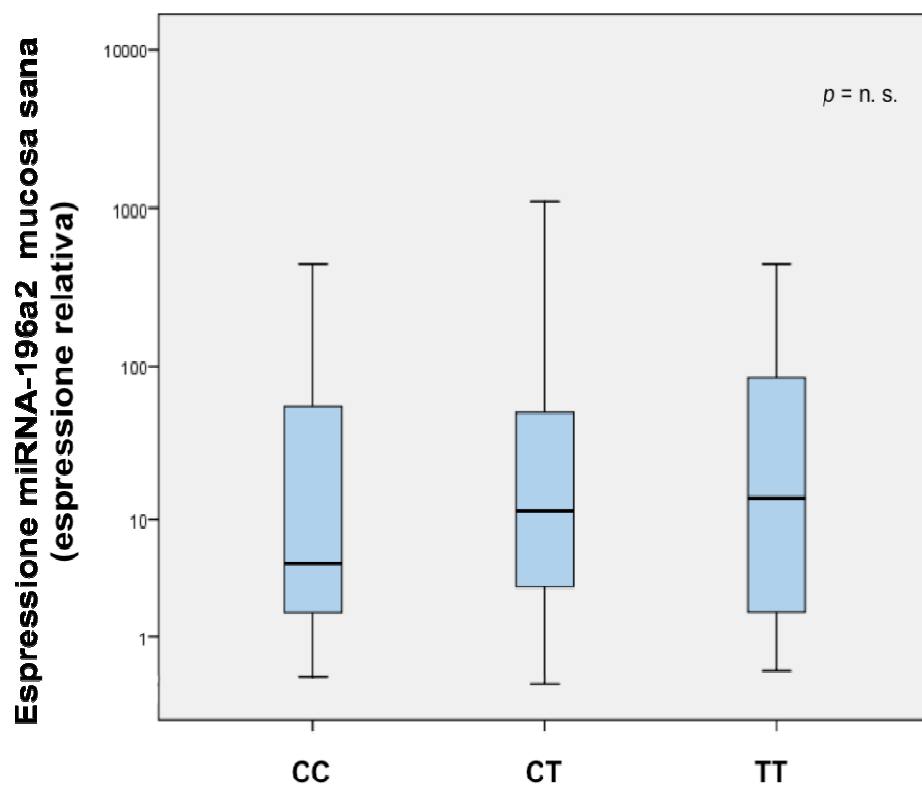


Figura 65. Correlazione fra espressione del miR-196a2 e genotipo nella mucosa sana.

ESPRESSIONE miR-499x1000 TESSUTO TUMORALE				
GENOTIPOmiR-499	MEDIANA	MINIMO	MASSIMO	<i>p</i>
GG	0.5	0.01	217.6	0.063
AG	0.8	0.02	101.5	
AA	1.8	0.01	869.3	

ESPRESSIONE miR-499x1000 MUCOSA SANA				
GENOTIPOmiR-499	MEDIANA	MINIMO	MASSIMO	<i>p</i>
GG	1,01	0.04	1000	0.247
AG	2	0.15	50.77	
AA	1,01	0.01	422	

Tabella 26 Mediana (relativo minimo e massimo) dell'espressione del miR-499 nei tessuti tumorali e nella rispettiva mucosa sana confrontati con il genotipo del rispettivo miRNA.

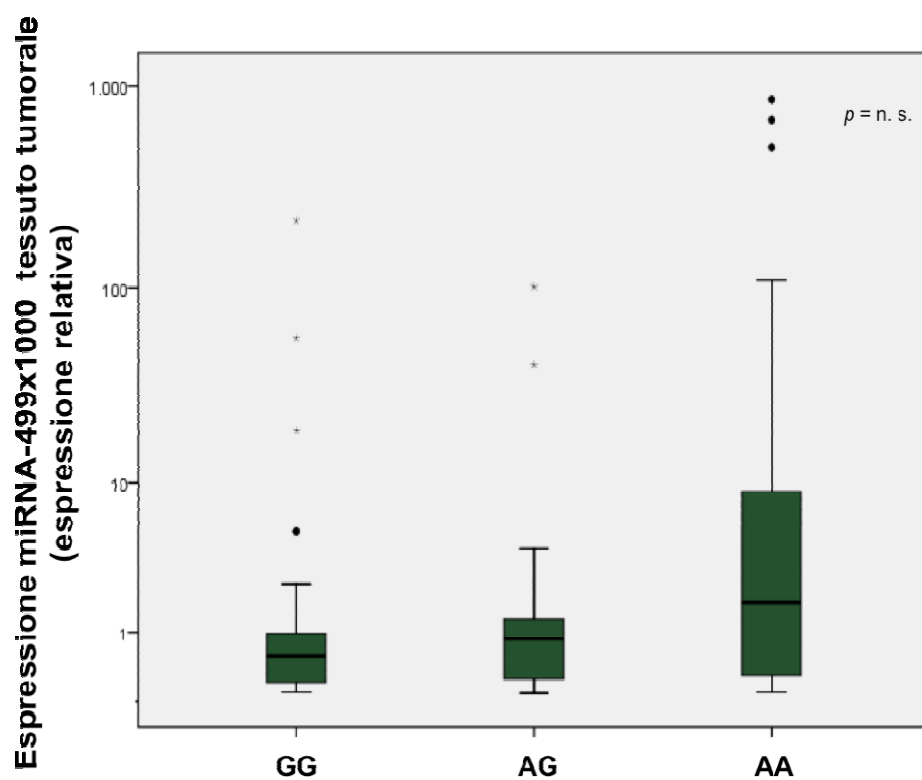


Figura 66. Correlazione fra espressione del miR-499 e genotipo nel tessuto tumorale.

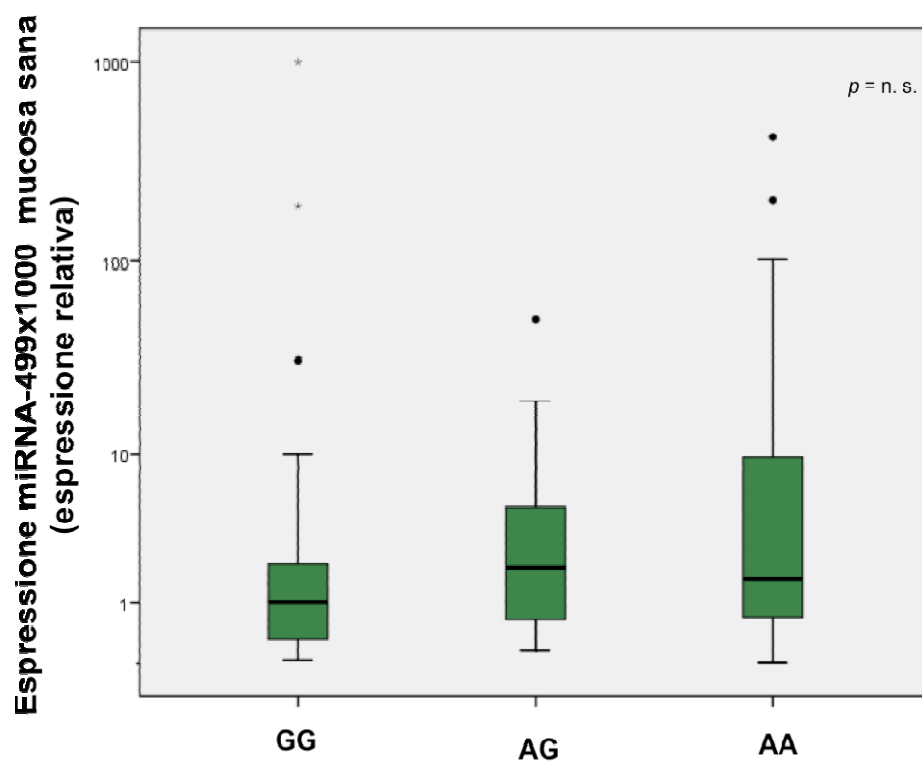


Figura 67. Correlazione fra espressione del miR-499 e genotipo nella mucosa sana.

Abbiamo quindi valutato il livello di espressione dei miR-146a, miR-149, miR-196a2, miR-499 rispetto alla presenza di un genotipo specifico dei pazienti affetti da cancro colon-rettale.

Nei grafici sottostanti sono riportati i risultati relativi a quest'ultima analisi.

E' stata dimostrata una differenza statisticamente significativa per il miR-499 sia nel raggruppamento GGAG vs AA ($p=0.022$) che nel raggruppamento GG vs AAAG ($p=0.05$) (Fig.71). Per gli altri tre miRNA non è stata osservata una differenza significativa (Fig.68-70).

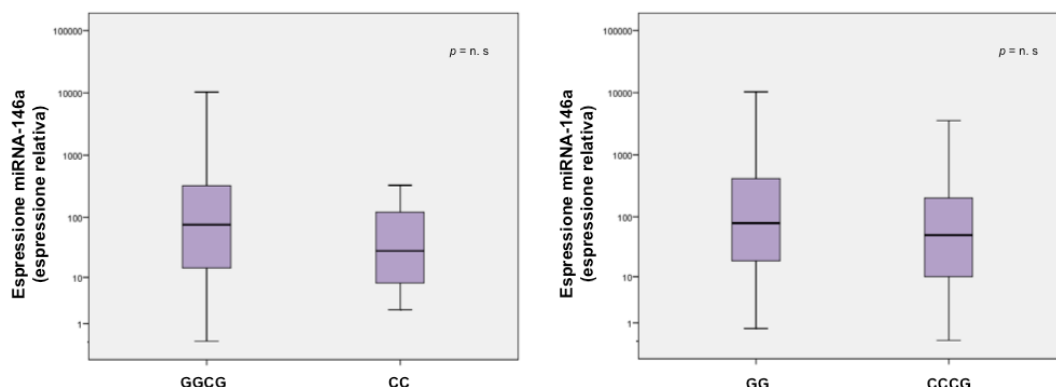


Figura 68. Correlazione fra espressione del miR-146a e presenza di un allele specifico.

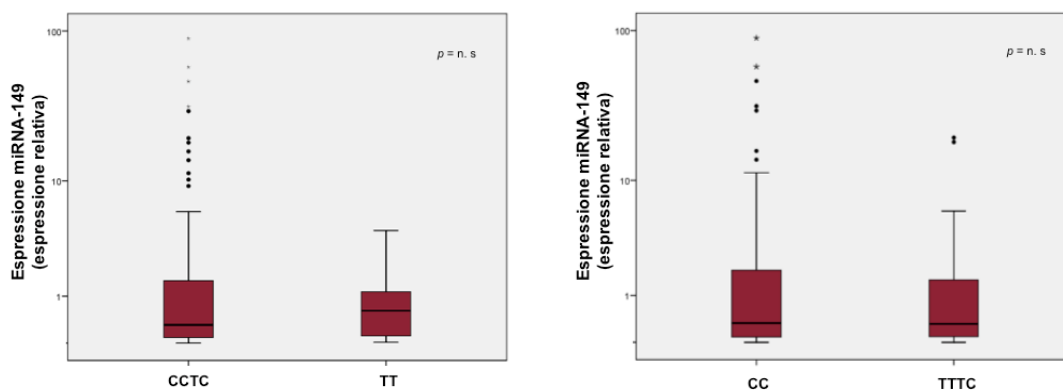


Figura 69. Correlazione fra espressione del miR-149 e presenza di un allele specifico.

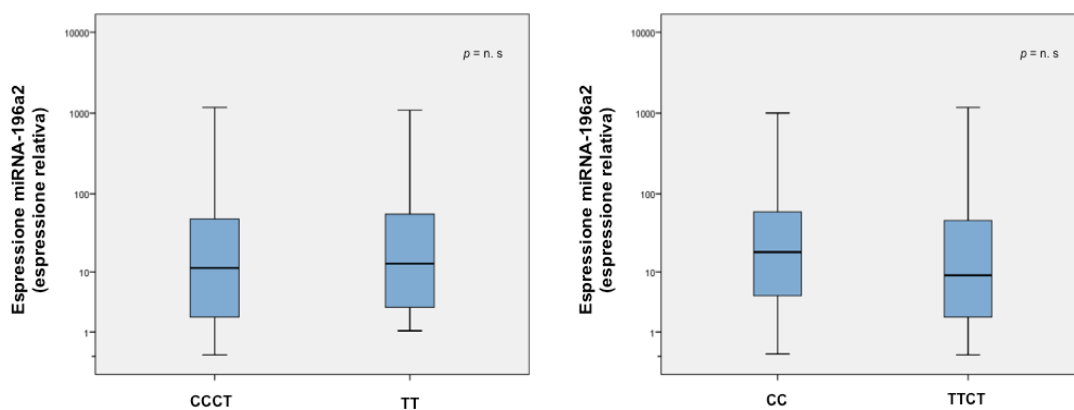


Figura 70. Correlazione fra espressione del miR-196a2 e presenza di un allele specifico.

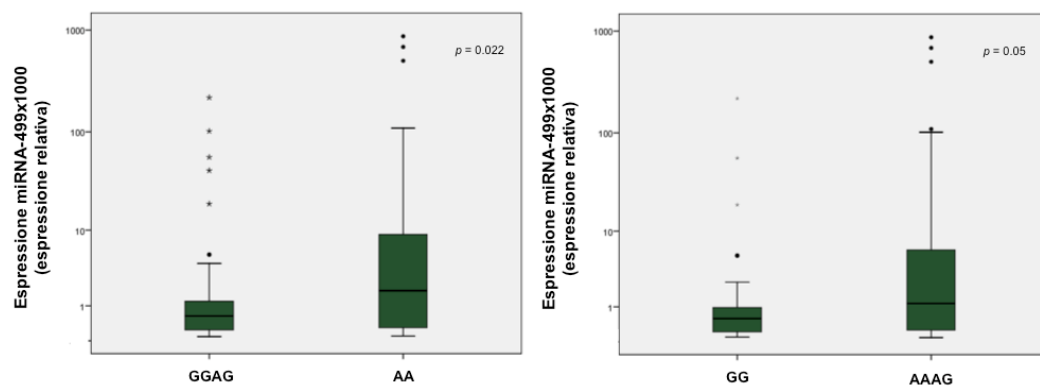


Figura 71. Correlazione fra espressione del miR-196a2 e presenza di un allele specifico.

11. CONCLUSIONI

Come indicato nella premessa di questa tesi, i miRNA sono piccoli RNA non codificanti capaci di silenziare specifici mRNA regolarmente trascritti. Uno specifico miRNA può esercitare la sua azione su un numero potenzialmente molto elevato di sequenze target, così come un trascritto può contenere sequenze di riconoscimento per diversi miRNA. Questo complesso network di possibili influenze reciproche rappresenta comunque un meccanismo di regolazione genica molto importante in malattie come il cancro. L'azione globale dei miRNA è in questo caso rappresentata dal reprimere o attivare l'espressione di geni coinvolti nella carcinogenesi.

Lo studio dell'azione di ciascun miRNA nella tumorigenesi umana è complicata dalla scarsa conoscenza di quali siano gli effettivi target regolati dal miRNA stesso. Conoscere le modificazioni quantitative dell'espressione di un singolo miRNA non è talora correlabile ad un suo effetto sul fenotipo della cellula trasformata o in via di trasformazione neoplastica.

Qualunque sia l'azione finale di un miRNA, il meccanismo attraverso il quale la sua attività regolatrice viene esplicata si basa sull'appaiamento tra il miRNA stesso e il suo ipotetico mRNA target. Come precisato nella premessa il grado di appaiamento tra le due specie ad RNA determina anche l'effetto finale dell'azione da parte del miRNA: degradazione o blocco trascrizionale dell'mRNA.

La prima variabile che influenza l'efficacia dell'azione repressiva di un miRNA è ovviamente legata al suo grado di espressione, un aumento o una diminuzione del livello di sintesi del miRNA influenza quantitativamente l'efficacia biologica.

A complicare questo già complesso meccanismo di possibili interazioni multiple è recentemente emersa un'altra possibile caratteristica capace di influenzare l'efficacia dell'azione di un gruppo ristretto, ma numericamente significativo, di miRNA che presentano all'interno e nelle vicinanze delle loro sequenze codificanti variazioni di sequenza. Questi SNP possono, secondo alcuni, determinare una variazione significativa dei livelli di espressione del miRNA stesso.

Ma l'altro aspetto che ovviamente è giusto chiamare in causa è l'effetto che le varianti di sequenza possono produrre nel regolare i meccanismi di accoppiamento miRNA/mRNA, che come riportato sopra influenzano la capacità stessa di determinare la trascrizione del gene specifico.

All'interno del gruppo dei geni MIR per i quali è già descritta la presenza di varianti puntiformi di sequenza, la nostra attenzione si è concentrata su hsa-mir-146a (rs2910164C-G), hsa-mir-

196a2 (rs11614913 C-T), hsa-mir-499 (rs3746444G-A) e hsa-mir-149 (rs2292832 G-T) e sul loro possibile ruolo nel carcinoma del colon-retto.

Il nostro studio caso-controllo è partito dalla valutazione della distribuzione dei diversi genotipi nei due gruppi per indagare 160 pazienti affetti da carcinoma del colon-retto e un gruppo comparabile per età e sesso di 178 soggetti sani di controllo.

Vista la necessità di screenare un numero abbastanza grande di soggetti per quattro diverse variabili genetiche, avevamo la necessità di adottare una tecnica rapida, sensibile ed economica, per la caratterizzazione dei diversi genotipi. In questo senso l'HRM si è rivelata particolarmente idonea per permetterci di identificare tutti i campioni; tuttavia i dati sono stati confermati tramite sequenziamento diretto.

Per 3 su 4 dei geni esplorati in questo studio non abbiamo valutato differenze statistiche nella distribuzione dei possibili genotipi tra la popolazione clinica in esame e il gruppo di controllo. Al contrario nel caso del miR-499 abbiamo riscontrato una differenza significativa nella distribuzione dei genotipi fra i tessuti provenienti da pazienti affetti da tumore al colon-retto e i soggetti di controllo.

In particolare, abbiamo identificato una frequenza significativamente maggiore del genotipo GG nei pazienti con cancro del colon retto e comunque una maggiore incidenza dell'allele G in questo tipo di pazienti.

Questo risultato sembra concordare con quanto precedentemente riportato nel cancro della mammella, dove gli autori hanno dimostrato che la variante genetica a carico del miR-499 A>G è associata in modo significativo con un rischio maggiore di sviluppare questa neoplasia.

A rafforzare questo dato contribuisce anche il nostro risultato secondo il quale la distribuzione genotipi di questo miRNA nei pazienti affetti da cancro colon-rettale non segue la legge di Hardy-Weinberg mentre risulta in equilibrio la distribuzione dei genotipi dei miRNA dei soggetti di controllo.

La numerosità non elevata dei casi studiati non ci permette di trarre conclusioni definitive sull'aumentato rischio di carcinoma del colon retto in pazienti con genotipo GG per questo miRNA, ma la concordanza con altri studi clinici sembra deporre a favore di un ruolo attivo del determinare modificazioni permanenti della funzione di questo miRNA con possibile ricaduta sulla funzione di mRNA, attivamente coinvolti nella carcinogenesi.

Ovviamente non è facilmente comprensibile quello che potrebbe essere la connessione tra genotipo e alterata funzione. Un'ipotesi plausibile sostenuta dal nostro risultato dimostra come nel nostro gruppo, il miR-499 sia l'unico che mostra una differenza statisticamente significativa tra i suoi livelli di espressione nel tessuto tumorale in confronto a quelli sani appaiati. In particolare nel tessuto tumorale, l'espressione appare significativamente ridotta. Questo dato

tende a dare a questo miRNA una funzione regolatrice negativa nei tessuti sani, che viene parzialmente persa nel caso di trasformazione neoplastica della cellula stessa.

Date queste premesse è stato opportuno valutare in ultimo l'influenza dei singoli genotipi sull'espressione del miRNA stesso.

Ancora una volta, mentre per i miR-146a, miR-149 e miR-196a2 non siamo riusciti a dimostrare alcuna variazione significativamente associata ad uno specifico genotipo o allele, nel caso del miR-499, il genotipo GG da solo o in combinazione GG/AG tende ad influenzare l'espressione del miRNA stesso. In particolare, l'allele G sembra determinare una diminuzione significativa dell'espressione.

Possiamo genericamente concludere che il miR-499 può determinare un'azione importante nel favorire un aumento del rischio del carcinoma del colon-retto, probabilmente attraverso la presenza di uno specifico genotipo che svolge la sua azione carcinoma favorente attraverso la parziale inibizione dell'espressione del miRNA stesso.

Non possiamo ovviamente escludere, ma nemmeno comprovare allo stato attuale, che la presenza della specifica variante di sequenza possa invece avere un'azione diretta tramite modificazione del grado di omologia tra miRNA e mRNA target.

ESPRESSIONE E METILAZIONE DEI MICRORNA NEL CRC

12. EPIGENETICA E MICRORNA

12.1 Epigenetica

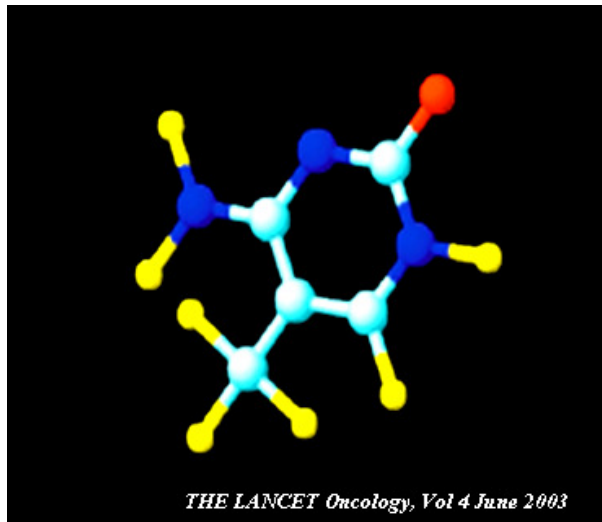


Figura 72 Struttura chimica della 5'Metilcitosina

La cromatina è una struttura altamente ordinata costituita da ripetizioni nucleosomiche connesse al DNA; è costituita da DNA, istoni e proteine non istoniche, condensate all'interno di complessi nucleoproteici funzionanti da template per tutta l'informazione genetica degli eucarioti [316]. La cromatina è divisa in due distinti stati conformazionali: 1) eterocromatina, densamente compattata e trascrizionalmente inattiva; 2) eucromatina, decondensata e

trascrizionalmente attiva. Con il termine epigenetica si intendono tutti quei meccanismi di regolazione dell'espressione genica ereditabili mitoticamente e meioticamente senza nessuna alterazione della sequenza del DNA [317]. La regolazione epigenetica di solito prevede la metilazione del DNA e le modificazioni istoniche; entrambi questi meccanismi hanno un ruolo importante nella regolazione genica, nello sviluppo e nella carcinogenesi [318,319,320].

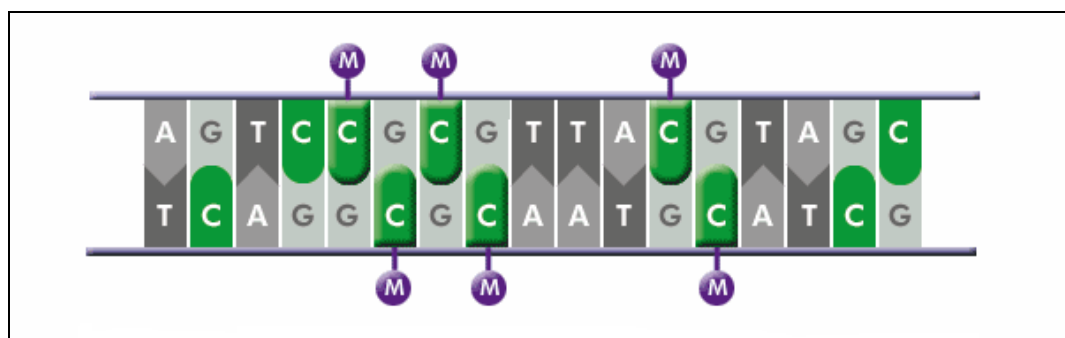


Figura 73 Sequenza del DNA metilata

La metilazione del DNA è un processo normalmente usato dalle cellule di mammifero per mantenere un normale pattern di espressione; è coinvolta nella regolazione dell'espressione dei geni sottoposti ad imprinting e all'inattivazione del cromosoma X [321,322,323]. La metilazione del DNA accade quasi esclusivamente su una citosina in un dinucleotide CpG ed è

ottenuta attraverso l'aggiunta di un gruppo metile in posizione 5 dell'anello della citosina mediato dalle DNA metiltransferasi (DNMT) (Fig 72-74).

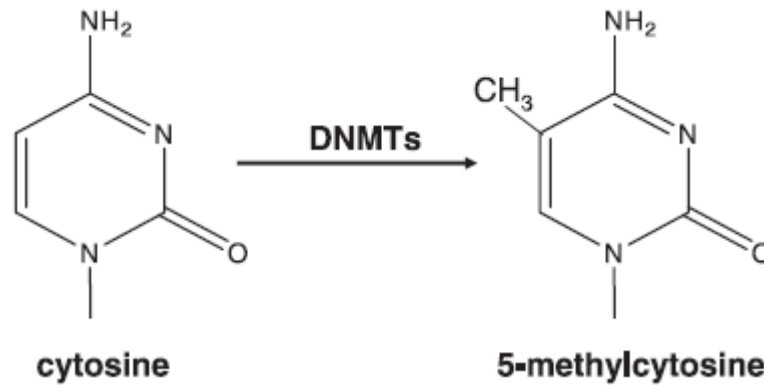


Figura 74 Meccanismo di metilazione del DNA

I siti CpG sono distribuiti in modo asimmetrico all'interno del genoma; infatti si trovano regioni povere e regioni ricche di CpG chiamate "isole CpG" [324,325], spesso localizzate nella regione del promotore della metà di tutti i geni codificanti per proteine.

La maggior parte del genoma è piuttosto scarsa di CpG a causa della mutagenicità delle citosine metilate; infatti una citosina metilata può andare incontro a deaminazione spontanea diventando una guanina (Fig 75) [317,326].

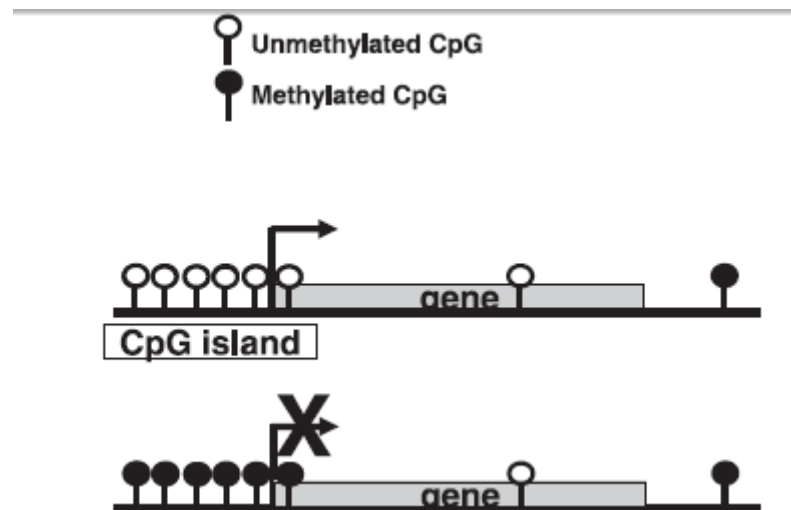


Figura 75 Isole CpG non metilate all'interno del promotore genico induce l'attivazione della trascrizione genica; Isole CpG metilate all'interno del promotore genico causa il silenziamento trascrizionale

Le isole CpG normalmente rimangono non metilate, mentre gli sporadici siti CpG nel resto del genoma sono normalmente metilati. C'è una graduale inversione del pattern di metilazione durante l'invecchiamento che induce una metilazione sporadica delle isole CpG e una perdita globale di metilazione; questo cambiamento è particolarmente pronunciato durante la carcinogenesi (Fig 75 e 76) [317,327].

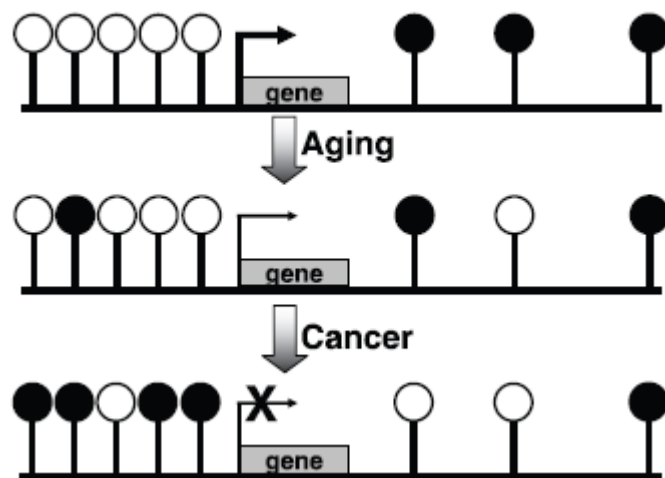


Figura 76 Cambiamenti dello status di Metilazione del DNA durante l'invecchiamento, ma soprattutto durante la cancerogenesi

La metilazione delle isole CpG nella regione del promotore spesso è associata al silenziamento genico, e l'alterata metilazione del DNA accade nella maggior parte dei tumori causando il silenziamento di alcuni geni oncosoppressori (Fig. 77) [318,327].

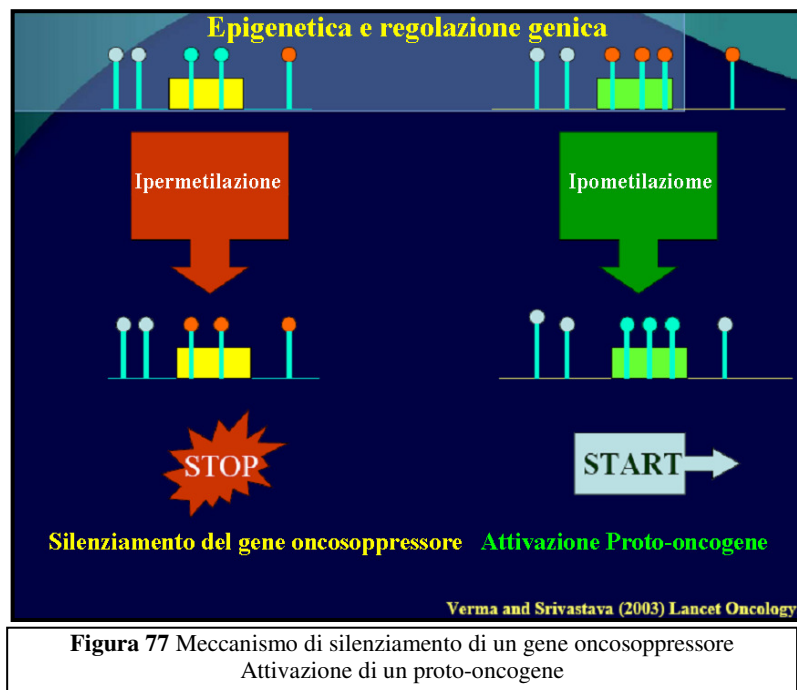


Figura 77 Meccanismo di silenziamento di un gene oncosoppressore
Attivazione di un proto-oncogene

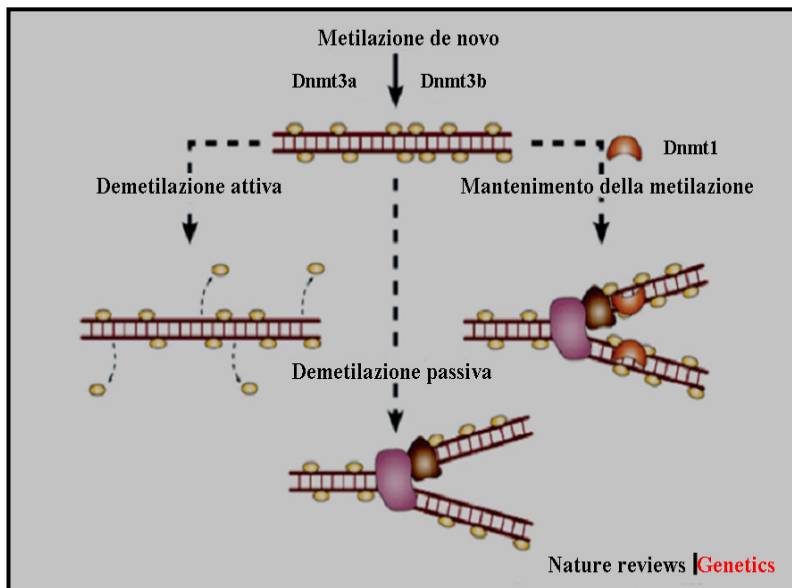


Figura 78 Rappresentazione schematica della funzione delle DNA metiltransferasi

Ci sono tre principali enzimi coinvolti nello stabilire e nel mantenere i pattern di metilazione: le DNMT3A e 3B sono le metiltransferasi *de novo*, e le DNMT1 che assicurano il mantenimento della metilazione del DNA copiandola fedelmente durante ogni divisione cellulare (Fig.78) [328].

La modificazione degli istoni, soprattutto le modificazioni post-trascrizionali dei domini delle code amino-terminali sono importanti meccanismi epigenetici che controllano l'espressione genica [317]. Certe modificazioni istoniche, come l'acetilazione degli istoni, sono associate ad un'attiva trascrizione genica, mentre altre, come la metilazione dell'istone H3 nella lisina 9 (H3K9) è un indicatore di cromatina condensata e inattiva (Fig. 79) [317, 329,330].

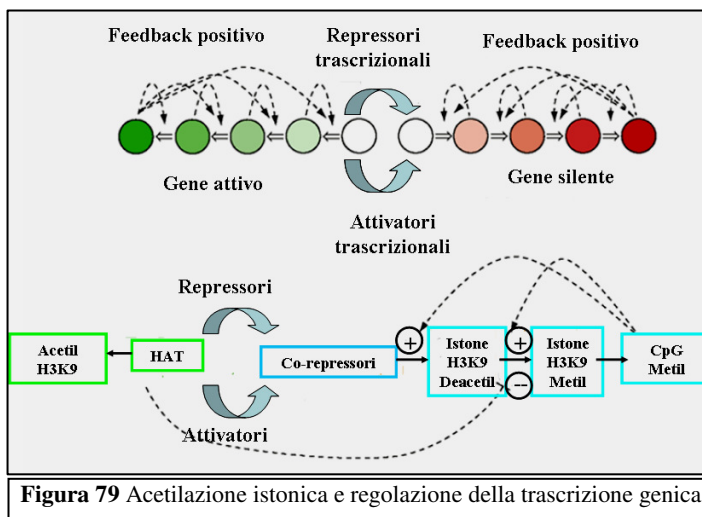


Figura 79 Acetilazione istonica e regolazione della trascrizione genica

Sembra che la metilazione del DNA e le modificazioni istoniche cooperino nel controllare l'espressione genica. Per esempio, la metilazione dell'istone H3 sulla lisina 9 può essere innescata dalla metilazione del DNA [331,332,333]; le DNMT sono state viste interagire con l'istone deacetilasi (HDAC), con l'istone metiltransferasi e con le proteine leganti le citosine metilate (Tab.27) [334,335,336].

<i>Caratteristica</i>	<i>Cromatina attiva</i>	<i>Cromatina inattiva</i>
<i>Conformazione della cromatina</i>	Estesa, aperta	Condensata
<i>Metilazione del DNA</i>	Poco metilata specialmente nelle regioni del promotore	Metilata
<i>Acetilazione degli istoni</i>	Istoni acetilati	Istoni non acetilati

Tabella 27 Caratteristiche della cromatina attiva ed inattiva

E' sempre più evidente l'associazione tra alterazioni epigenetiche, come l'ipermetilazione del DNA e le malattie umane, compreso il tumore; a differenza dei cambiamenti genetici che causano il tumore, le modificazioni epigenetiche dell'espressione genica coinvolgono generalmente più di un gene [317].

Molti farmaci hanno effetti nell'invertire le anomalie epigenetiche che accadono durante la carcinogenesi, e sono divisi in due classi: 1) gli inibitori della metilazione del DNA ; 2) gli inibitori delle HDAC [317,337]; questi farmaci sono una grande speranza nel miglioramento della terapia antitumorale[338].

12.2 Espressione dei MiRNA regolata dai Meccanismi Epigenetici

L'espressione dei microRNA può essere alterata da diversi meccanismi: il primo è quello delle anomalie cromosomiche, come suggerito dalle evidenze che i miRNA sono frequentemente localizzati nei siti fragili del genoma, molti dei quali coinvolti nelle alterazioni tumorali [62]; il secondo meccanismo è quello delle mutazioni [57] e dei polimorfismi (Fig.80) [176].

Tuttavia l'alterazione dell'espressione dei miRNA può essere causata da difetti nel loro meccanismo di biogenesi, ad esempio a causa di un'alterata attività di Drosha o Dicer in diversi tipi di tumori [60,67,339,340], o per l'alterazione dell'attività di diversi fattori trascrizionali (Fig.80) [217,341,342].

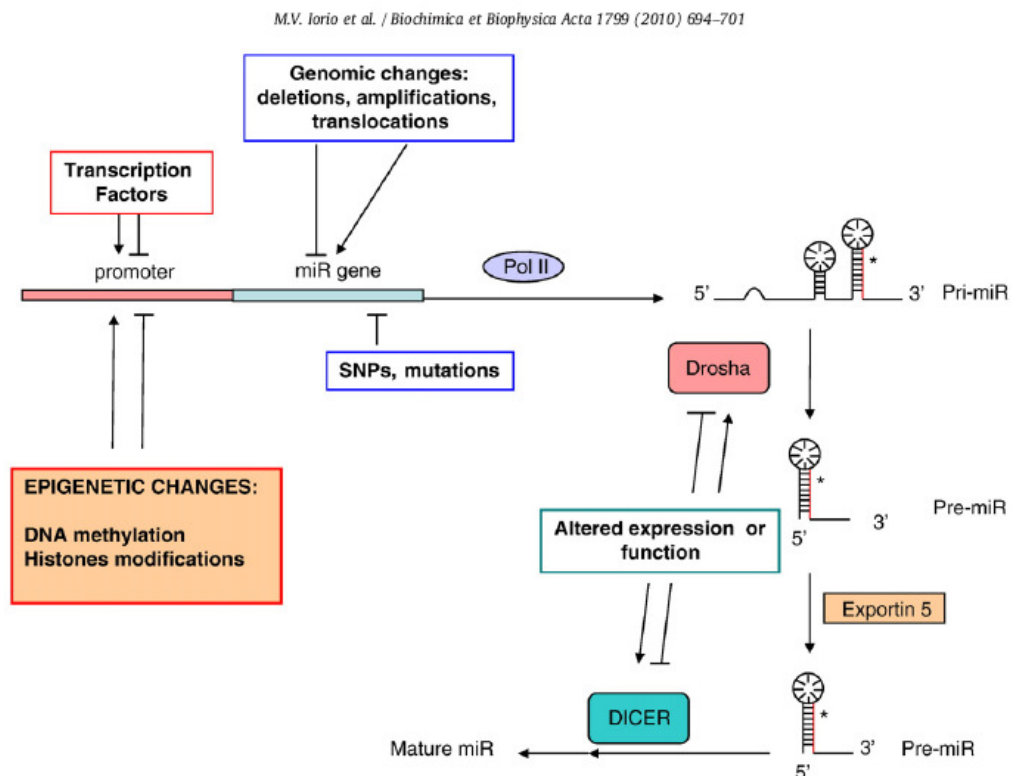


Figura 80 Meccanismi che possono alterare la regolazione dei miRNA

In aggiunta, anche i meccanismi epigenetici, come la metilazione del promotore o l'acetilazione degli istoni, possono modulare l'espressione dei miRNA e l'alterazione dei livelli dei miRNA è stata trovata in diverse malattie, tra cui il cancro (Fig.80 e tab. 28).

Epigenetically regulated microRNAs.

miRNA	Location	Tissue type	Target	References
miR-127	14q32.31	Bladder cancer	BCL6	Saito et al. [37]
miR-9	1q22 (miR-9-1) 5q14.3 (miR-9-2) 15q26.1 (miR-9-3) 11q23.1	Breast cancer Metastases		Lehmann et al. [38] Lujambio et al. [40]
miR-34b/c	11q23.1	Colorectal cancer	CDK6, c-MYC; E2F3	Toyota et al. [39]
miR-148a	7p15.2	Metastases Breast cancer Cervical cancer Cholangiocarcinoma	TGIF2	Lujambio et al. [40] Lujambio et al. [40] Lehmann et al. [38] Duursma et al. [68]
miR-203	14q32.11	ALL	DNMT3b	Braconi et al. [69]
miR-200c/ miR-141	12p13.31	Breast, prostate cancer	DNMT1	Bueno et al. [41]
let-7a-3	22q13.31	Lung cancer	ABL1	Vrba et al. [42]
miR-21	17q23.2	Ovarian cancer	IGF2	Brueckner et al. [46]
miR-1	20q13.33 (miR-1-1) 18q11.2 (miR-1-2)	HCC		Lu et al. [48]
miR-124a	8p23.1 (miR-124a-1) 8q12.3 (miR-124a-2) 20q13.33 (miR-124a-3)	Colorectal cancer ALL	FOXP1, MET, HDAC4	Iorio et al. [47] Datta et al. [50]
miR-107	10q23.31	Gastric cancer	CDK6	Lujambio et al. [51]
miR-181c	1q31.3	Pancreatic cancer		Agirre et al. [56]
miR-223	Xq12	Gastric cancer	CDK6	Roman-Gomez et al. [55]
miR-512-5p	19q13.42	AML	NOTCH4, KRAS	Ando et al. [53]
Let-7i	12q14.1	Gastric cancer	NFI-A, MEF2C	Lee et al. [52]
miR-342	14q32.2	Cholangiocytes	MCL1	Hashimoto et al. [54]
miR-126	9q34.3	Colorectal cancer	NFI-A, MEF2C	Fazi et al. [58]
		Bladder cancer	MCL1	Saito et al. [60]
		Prostatic cancer	TLR4	O'Hara et al. [61]
miR-370	14q32.31	Cholangiocarcinoma		Grady et al. [62]
miR-449a, b	5q11.2 (miR-449a) (miR-449b)	Osteosarcoma	MAP3K8	Saito et al. [60]
		Prostatic cancer	CDK6, CDC25A	Meng et al. [70]
			HDAC1	Yang et al. [79]
				Noonan et al. [78]

Tabella 28 miRNA regolati Epigeneticamente

Un'analisi approfondita delle sequenze geniche dei miRNA ha dimostrato che la metà di loro è associata a isole CpG, suggerendo che i miRNA possono essere soggetti a questo meccanismo di regolazione[107].

Per analizzare la metilazione dei miRNA si deve analizzare il loro promotore che in più del 90% dei miRNA è localizzato ad una distanza di 1000bp dalla loro sequenza matura [343].

Alcuni studi hanno dimostrato che un'alterazione dello status di metilazione è responsabile dell'alterazione dell'espressione dei miRNA nel cancro, come il silenziamento di miRNA oncosoppressori. Infatti trattando le cellule tumorali di vescica T24 e fibroblasti umani con gli inibitori delle DNMT (5-Aza-2'-deossicitidina), Saito et al, hanno osservato una up-regolazione del miR-127, miRNA caratterizzato da un'isola CpG a livello del suo promotore, che ha come target il proto-oncogene BCL-6, silenziato in diverse cellule tumorali [64]. Con lo stesso approccio di riconoscere il silenziamento epigenetico dei miRNA indotto dal rimodellamento della cromatina tramite somministrazione di farmaci, è stato dimostrato che il miR-9-1 è ipermetilato e conseguentemente, downregolato nel tumore della mammella [112] così come il miR-34b e miR-34c nel CRC [344]. Inoltre l'alterata metilazione del miR-9, miR-34b e miR-34c, insieme con il miR-148a, sono stati correlati con le metastasi; l'espressione dei 4 miRNA è stata indotta trattando le cellule tumorali metastatiche linfonodali con agenti demetilanti e la riespressione del miR-148a e del miR-34b/c nelle cellule tumori attraverso l'inattivazione epigenetica, ha inibito la loro motilità, ha ridotto la crescita tumorale e ha compromesso la formazione delle metastasi in un modello xenograft, con un'associata downregolazione dei target oncogenici dei miRNA, come C-MYC, E2F3, CDK6 e TGIF2. Il coinvolgimento

dell'ipermetilazione dei miR-148a, miR-34b/c e miR-9 nella formazione delle metastasi è stato evidenziato anche in tumori primari umani [114]. Un meccanismo di silenziamento esercitato dall'ipermetilazione del promotore è stato riportato anche per il miR-203, che ha come target ABL1; il miR-203 è capace di ridurre i livelli della proteina di fusione BCR-ABL1 e di inibire la proliferazione cellulare nella leucemia linfoblastica acuta [345]. Più recentemente è stato osservato un meccanismo di silenziamento anche per il cluster miR-200c/miR-141 [346]; considerato il ruolo esibito dalla famiglia dei miR-200 nella regolazione della transizione epiteliale-mesenchimale, questo studio suggerisce che l'alterazione epigenetica potrebbe controllare la conversione fenotipica nella cellula normale, giustificando l'alterata espressione di questa famiglia di miRNA osservata nei tumori [347,348,349]. Al contrario l'overespressione di miRNA oncogenici nel cancro può essere dovuta all'ipometilazione osservata ad esempio nell'adenocarcinoma polmonare per let-7a-3 o nel tumore ovarico epiteliale per il miR-21, overespressi nel tessuto tumorale rispetto a quello sano [109]. Quindi il silenziamento di oncosoppressori o l'attivazione di oncogeni attraverso rispettivamente l'iper- e l'ipometilazione del DNA rappresenta un meccanismo usato dalla cellula tumorale per favorire la sua sopravvivenza, la sua proliferazione e la progressione della malattia. [338]. E' interessante osservare come il let-7a-3 risulta ipometilato nel tumore del polmone, dove la sua riattivazione è associata con un aumento del fenotipo tumorale e con cambiamenti nel profilo di espressione di oncogeni [350]; mentre è stato recentemente descritto ipermetilato nel tumore ovarico, dove il suo silenziamento correla con una diminuzione dell'espressione del IGF-II e una prognosi migliore [351]. Questi studi hanno dimostrato che probabilmente la regolazione epigenetica è tessuto specifica, così come l'espressione dei miRNA e il loro ruolo biologico. La regolazione della metilazione dei geni dei miRNA può essere esercitata anche da specifiche DNMT, come osservato nel caso del miR-1, metilato nelle linee cellulari provenienti dal carcinoma epatocellulare e nel tumore primario, ma non nel corrispondente tessuto sano dove è risultato ipometilato e quindi espresso nelle HCT116 DNMT1-/-, ma non nelle cellule HCT116DNMT3b-/-, indicando un ruolo chiave della DNMT1 nella sua metilazione [352]. Un approccio simile è stato impiegato per identificare i miRNA regolati epigeneticamente, analizzando il loro profilo di espressione nelle cellule tumorali di colon deficienti per DNMT1 e DNMT3b; tra i 18 miRNA overespressi rispetto alle cellule wild-type, solo uno è non metilato a livello della mucosa sana ma ipermetilato e quindi silenziato nel tumore, ed è il miR-124a, incluso in una grande isola CpG; il suo target è CDK6, che media la fosforilazione del gene oncosoppressore RB [110]. Un altro miRNA regolato epigeneticamente che ha come target CDK6 nei tumori pancreatici è il miR-107 [353]. La metilazione del miR-124 è stata correlata con la predisposizione al tumore gastrico principalmente indotto da *Helicobacter pylori* [354].

Nella carcinogenesi del tumore gastrico è stato recentemente osservato il silenziamento genico del miR-181c a causa dell'ipermetilazione del DNA [355]. Un' alterata regolazione epigenetica dei miRNA è stata descritta anche in pazienti affetti da leucemia linfoblastica acuta (ALL); Roman-Gomez, et al [356] hanno identificato 13 miRNA contenuti all'interno di un isola CpG e repressi trascrizionalmente nella ALL. Tra i miRNA riattivati dopo il trattamento con agenti demetilanti c'è il miR-124a, trovato ipermetilato nel 59% dei pazienti; inoltre, l'ipermetilazione del miR-124a è associato con una maggior probabilità di recidive e un più alto tasso di mortalità, essendo un indicatore prognostico[357]. Una interessante dimostrazione di come i fattori trascrizionali possono regolare l'espressione dei miRNA coinvolgendo i fattori trascrizionali a livello della regione del promotore è stato descritto da Fazi et al, dimostrando che l'oncoproteina di fusione AML1/ETO, (un prodotto anomalo della traslocazione t(8;21) che si verifica in AML) si lega alla regione del pre-miR-223 e silenzia epigeneticamente l'espressione del miRNA maturo attraverso il reclutamento degli enzimi rimodellanti la cromatina [118]. La metilazione del DNA non è l'unico meccanismo epigenetico che agisce sull'espressione dei miRNA: Scott et al [65] hanno osservato nelle cellule SKBR3, provenienti dal carcinoma della mammella, che l'inibizione dell'istone deacetilasi è seguita dalla rapida e ampia alterazione dei livelli dei miRNA. Il trattamento con inibitori delle DNMT come la 5-aza-2'-deossicitidina (5-Aza-CdR o DAC) e gli inibitori dell'istone deacetilasi, l'acido 4-fenilbutirico (PBA) inducono la riespressione del miR-512-5p silenziato, con la conseguente soppressione di Mcl-1 e inducono apoptosi nelle cellule tumorali gastriche[358]. Più recentemente, il complesso di repressori NFkappaB p50-C/EBP beta è stato dimostrato legarsi al promotore di let-7i successivamente agli stimoli microbiologici, promuovendo la deacetilazione dell'istone H3 e il silenziamento genico del miRNA[359]. Un quesito importante che deve essere chiarito è la connessione tra i miRNA e i loro geni ospiti. Un miRNA può essere contenuto all'interno di introni o esoni di uno specifico gene o risiede in regioni intergeniche.

I miRNA intronici, detti mirtroni[97,360], sono dei trascritti derivanti da piccoli introni e processati indipendentemente da Drosha, possono avere il loro promotore o essere co-regolati all'interno del gene ospite e quindi soggetti allo stesso controllo epigenetico, come riportato per il miR-342, localizzato in un introne di EVL (Ena/Vasp-like gene) [289], o per il miR-126 upregolato dal trattamento con gli inibitori delle DNMT e degli HDAC insieme ad uno dei trascritti genici ospiti, EGFL7 [361].

L'ipermetilazione delle isole CpG non è sempre un'alterazione correlata con una malattia specifica [362]; il profilo epigenomico ha rivelato che molte regioni con metilazione cancro specifica sono localizzate adiacenti alle isole CpG in regioni a bassa densità di nucleotidi

CpG, chiamate sponde (shores) CpG [**363**]. L'ipermetilazione di queste sponde sembra essere importante nella regolazione dell'espressione genica.

L'esistenza dei farmaci epigenetici, come gli inibitori delle DNMT e gli inibitori delle HDAC, capaci di invertire l'alterata metilazione o lo status di acetilazione, aumenta la possibilità di regolare i livelli dei miRNA, per ripristinare per esempio l'espressione dei miRNA oncosoppressori, in modo da invertire il fenotipo tumorale. L'interazione tra i miRNA e i meccanismi epigenetici è complicato dal fatto che i miRNA possono regolare anche le molecole coinvolte nella metilazione DNA o nell'acetilazione degli istoni [338].

12.3 Epi-MiRNA

I miRNA possono regolare l’espressione delle molecole della macchina epigenetica, creando un meccanismo di feedback altamente controllato. L’alterata espressione di questi miRNA , chiamati “epi-miRNA”, è stata collegata allo sviluppo e alla progressione tumorale (Fig. 81).

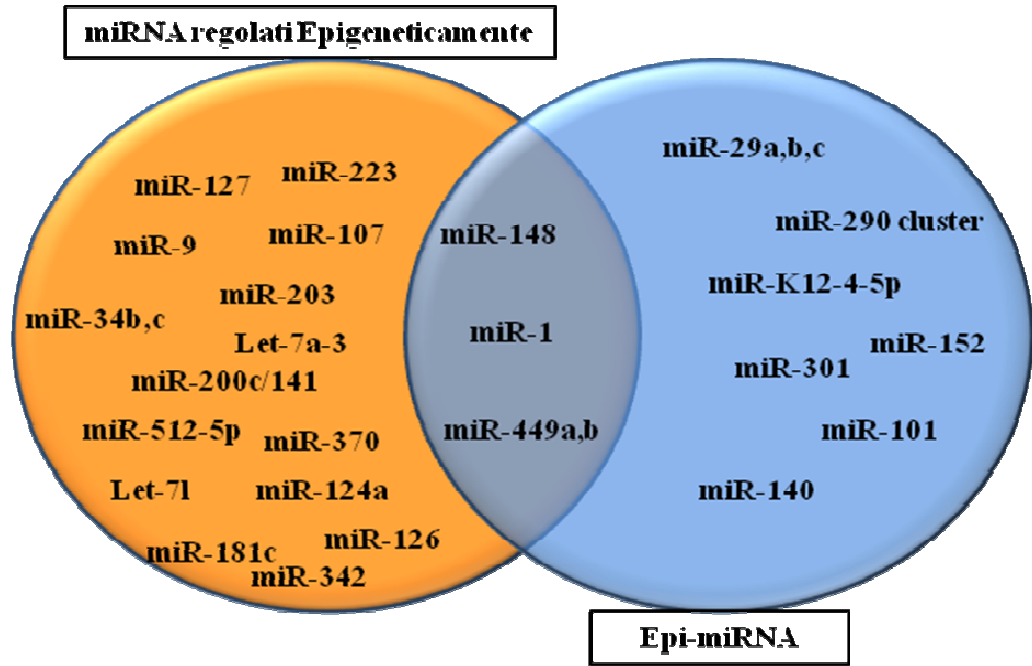


Figura 81 miRNA regolati epigeneticamente e Epi-miRNA

Le prime evidenze dell’esistenza degli epi-miRNA è stata riportata nel tumore del polmone, dove la famiglia del miR-29 ha come target le le DNA metiltransferasi *de novo* DNMT3A e -3B [364], e il mantenimento della DNMT1, anche se indirettamente attraverso le regolazione del transattivatore Sp1 [365].

Epi-miRNAs.				
miRNA	Location	Tissue type	Targets	References
miR-29a, b, c	7q32.3 (miR-29a)	Lung cancer	DNMT-3a, -3b	Fabbri et al. [19]
	7q32.3 (miR-29b-1)	AML	DNMT-3a, -3b, Sp1	Garzon et al. [65]
	1q32.2 (miR-29b-2)			
	1q32.2 (miR-29c)			
miR-290 cluster	7qA1	Mouse ES cells	RBL2	Benetti et al. [66] Sinkkonen et al. [67]
miR-K12-4-5p		KSHV virus	RBL2	Lu et al. [80]
miR-148a, b	7p15.2 (miR-148a)	Cervical cancer	DNMT3b	Duursma et al. [68]
	12q13.13 (miR-148b)			
miR-152	17q21.32	Cholangiocarcinoma	DNMT1	Braconi et al. [69]
	17q23.2	Cholangiocarcinoma	DNMT1	Braconi et al. [69]
		Cholangiocarcinoma	DNMT1	Braconi et al. [69]
		Prostatic cancer	EZH2	Varambally et al. [74]
miR-101	1p31.3 (miR-101-1)	Bladder cancer		Friedman et al. [73]
	9p24.1 (miR-101-2)			
miR-1	20q13.33 (miR-1-1)	Skeletal muscle tissue	HDAC4	Chen et al. [76]
	18q11.2 (miR-1-2)			
miR-140	8qD3	Mouse cartilage tissue	HDAC4	Tuddenham et al. [77]
miR-449a	5q11.2	Prostatic cancer	HDAC1	Noonan et al. [78]

Tabella 29 Epi-miRNA

Come detto precedentemente, il miR-148 è modulato epigeneticamente [112,114] e ha come target la DNMT3b legandosi alla sua regione codificante (e non al 3'UTR) [366]; le evidenze sperimentali suggeriscono l'esistenza di un possibile loop tra la macchina epigenetica e la regolazione dei miRNA. Braconi et al [367], hanno dimostrato che la DNMT1 è direttamente regolata dal miR-148a, insieme con il miR-152 e il miR-301 nel colangiocarcinoma. La downregolazione della DNMT1 attraverso la transfezione del miR-148a e del miR-152 ha permesso di ripristinare l'espressione dei geni oncosoppressori sensibili alla metilazione come Rassf1 e p16INK4a. Un altro miRNA con proprietà oncosoppressive collegato alla macchina epigenetica è il miR-101, downregolato in diversi tipi di tumore, come nel tumore ovarico [109], e nel carcinoma del colon, dove il suo target è COX-2 [368]; nel carcinoma epatocellulare [369], induce apoptosi e inibisce la crescita silenziando Mcl1. Come recentemente dimostrato sia nel tumore della vescica che in quello della prostata [370,371], il miR-101 è capace di modulare direttamente l'espressione di EZH2, subunità catalitica del complesso repressivo polycomb 2 (PRC2), mediando il silenziamento epigenetico attraverso la trimetilazione dell'istone H3 lisina 27 e alterando i geni oncosoppressori silenziati nel tumore. Anche gli enzimi che regolano l'acetilazione degli istoni possono essere diretti dagli epi-miRNA; ad esempio il miR-1 (coinvolto nella miogenesi e nello sviluppo di diverse patologie) e il miR-140 (alterato in diversi tipi di tumori come quello ovarico [109] e nelle cellule tumorali di colon) [372] hanno come target HDAC4 [373,374]; mentre la regolazione di HDAC1 è direttamente mediata dal miR-449a. La transfezione del miR-449a causa il blocco del ciclo cellulare, l'apoptosi e un fenotipo senescente nelle cellule tumorali di prostata (Tab. 29) [375].

12.4 MiR-34 e il suo coinvolgimento in diverse patologie

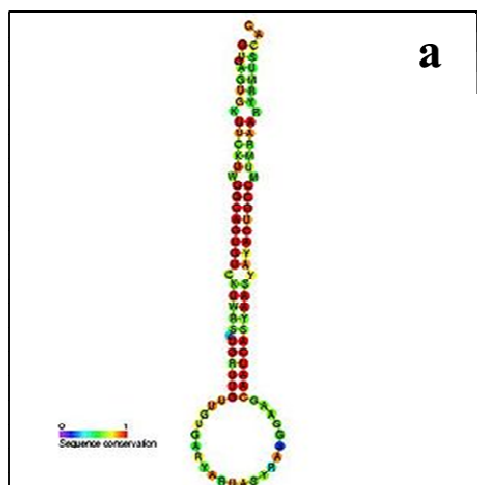
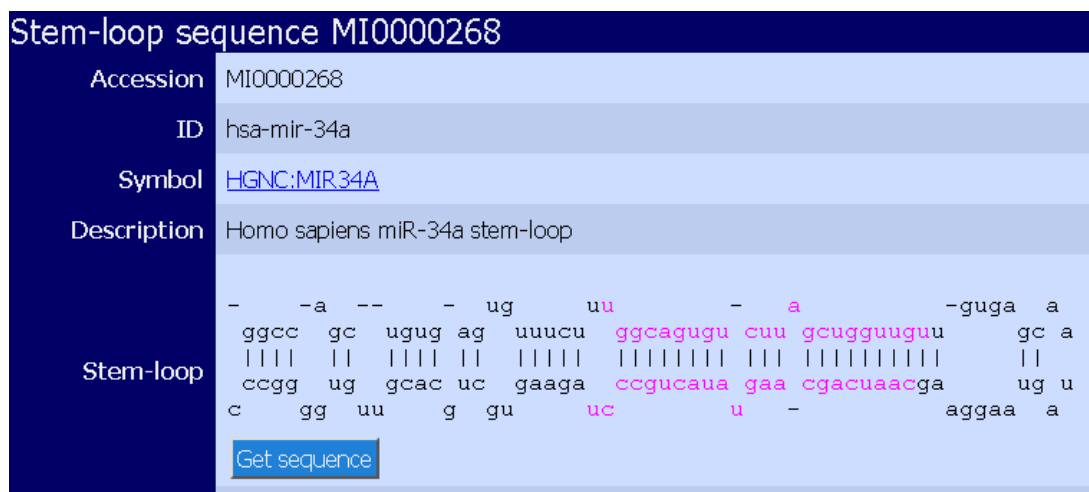


Figura 82 MiR-34b/c

La famiglia del *miR-34* umano è composta da 3 membri: il gene che codifica il *miR-34a* è localizzato sul cromosoma 1p36 (Fig. 82, 83), mentre il *miR-34b* e il *miR-34c* sono localizzati rispettivamente nell'introne 1 e nell'esone 2 sul cromosoma 11q23. I miR-34b e -34c sono co-trascritti da un singolo trascritto primario, da cui deriva il miR-34b/c maturo (Fig. 84 e 85) [376,377].



a



b

Figura 83a: miR-34a: localizzazione Cromosomica
b: pre-miR-34a: in rosa le sequenze mature

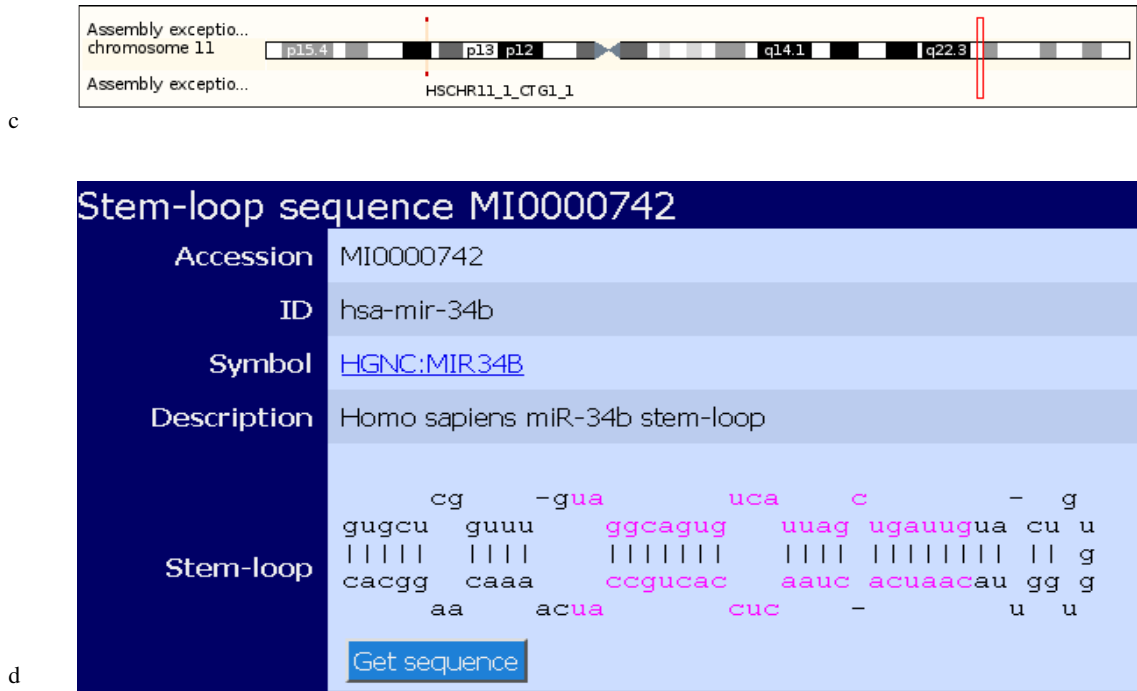


Figura 84 c: miR-34b: localizzazione cromosomica
d: pre-miR-34b: in rosa le sequenze mature

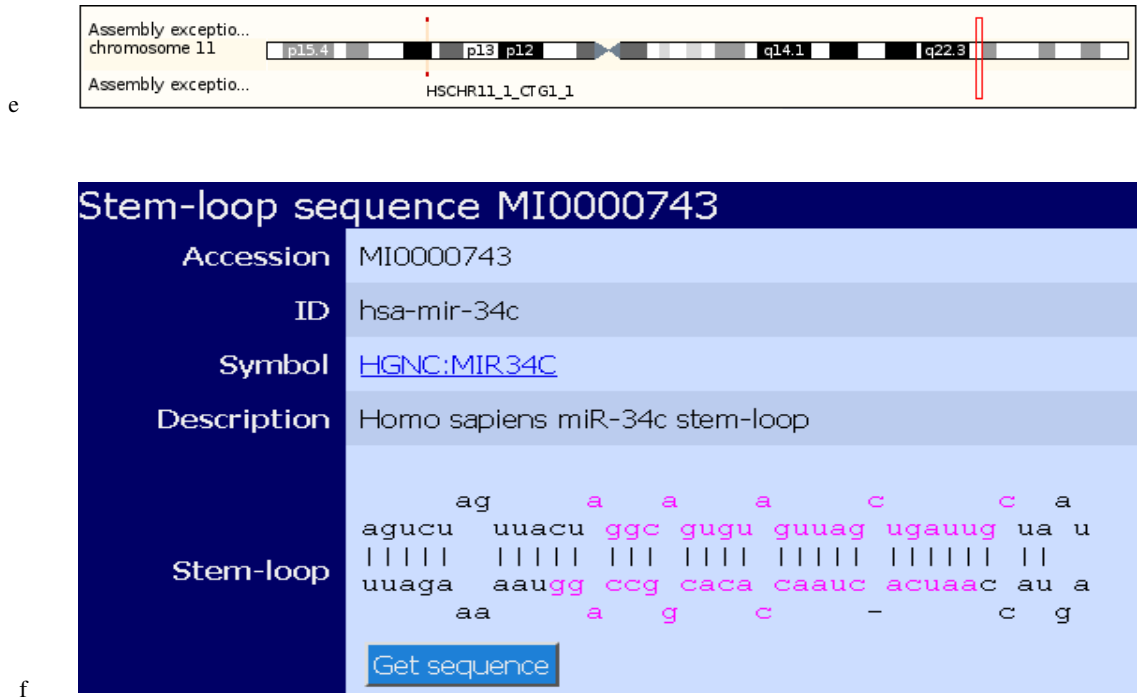


Figura 85 e: miR-34c: localizzazione cromosomica
f: pre-miR-34c: in rosa le sequenze mature

Quindi ci sono due loci per i miR-34: uno codifica per il miR-34a e l'altro codifica sia per il miR-34b che per il miR-34c; la regione del promotore di entrambi i loci contiene un sito di legame per p53 (Fig. 86) [215].

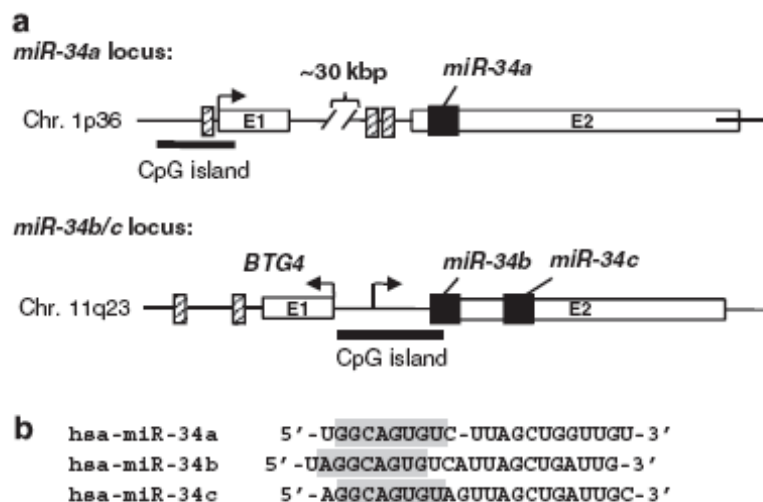


Figura 86 Confronto fra i membri della famiglia dei miR-34: miR-34a e miR-34b/c.

a) Struttura dei loci dei geni dei miR-34a e miR34b/c. I rettangoli bianchi e neri rappresentano rispettivamente gli esoni e i miRNA, i rettangoli bianchi con le linee parallele indicano i siti di legame di p53; le isole CpG sono rappresentate da linee spesse nere.

b) Allineamento delle sequenze mature dei miR-34a, miR-34b e miR-34c

Secondo diversi studi sembra che i fattori di trascrizione e l'oncosoppressore p53 siano capaci di transattivare i geni della famiglia dei miR-34 [215,217,342,378,379,380]; infatti la loro overespressione è direttamente indotta da p53 in risposta a DNA danneggiato o a stress oncogenici (Fig. 87) [215].

La famiglia dei miR-34 risulta downregolare diverse proteine regolatorie (come BCL2, ciclina D1 ecc), mediando presumibilmente una funzione oncosoppressiva (Fig 87) [381].

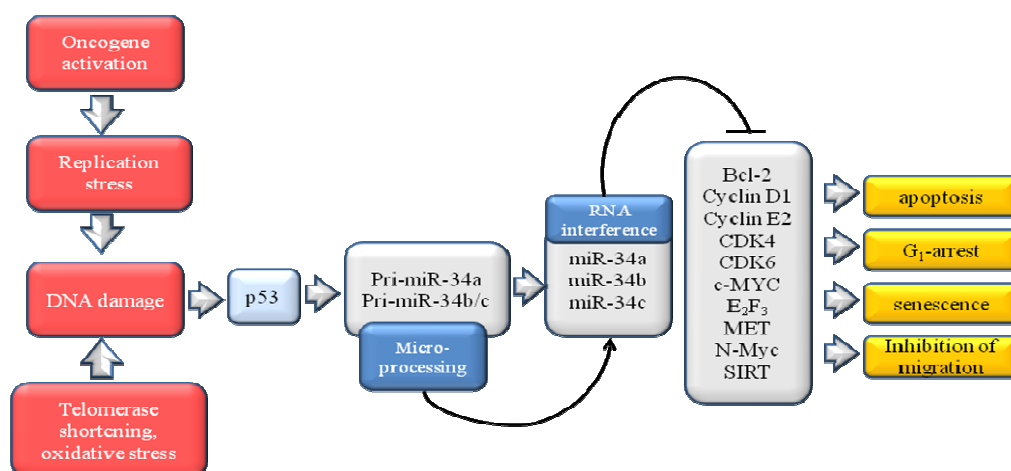


Figura 87 Ruolo svolto dalla famiglia dei miR-34 nel cancro.

In un modello murino, il miR-34a è ubiquitariamente espresso nei tessuti, con una più alta espressione nel tessuto cerebrale [382], mentre il miR-34b/c è principalmente espresso nei tessuti polmonari [380]; queste analisi hanno mostrato che il miR-34a è espresso a livelli più alti rispetto al miR-34b/c, ad eccezione del polmone, in cui il miR-34b/c è espresso maggiormente. Quindi i geni dei due miR-34 presumibilmente hanno una funzione tessuto-specifica [381].

Inaspettatamente l'espressione ectopica della famiglia dei miR-34 ha effetti drastici sulla proliferazione e sulla sopravvivenza, causando un arresto del ciclo cellulare in fase G₁ [308]; in aggiunta il miR-34b/c inibisce la proliferazione e la formazione di colonie in soft agar [308]. Inoltre l'introduzione del miR-34a e del miR-34b/c nei fibroblasti primari diploidi umani induce la senescenza cellulare [215] e un blocco permanente del ciclo cellulare (importante per il processo di invecchiamento) [383]. Poiché il blocco del ciclo cellulare e l'apoptosi sono comuni end point dell'attivazione p53, i geni dei miR-34 possono essere potenti mediatori oncosoppressivi attraverso p53. Attraverso l'induzione ectopica dei diversi membri della famiglia dei miR-34 in diverse linee cellulari, è stato possibile rilevare centinaia di target ad mRNA dei miR-34 downregolati [215,217,380], in particolare quelli coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare e nella risposta al DNA danneggiato, tra questi CDK4/6, la ciclina E2, MET e Bcl2 (Tab 30) [215,380]. L'alta similarità tra i 3 membri della famiglia del miR-34 (Fig. 86.) permette al miR-34a e al miR-34b/c di agire sugli stessi target [215] , tuttavia ci possono essere delle differenze nell'affinità tra i diversi target dovuti alla perfetta omologia tra la sequenza del miRNA e il 3'-UTR del gene target, come nel caso di c-MYC, che sembra essere regolato principalmente da miR-34b/c [114,384,385]; questo può essere spiegato da una maggiore complementarità tra la sequenza seed del miR-34b e la sequenza nel 3'UTR in c-MYC, quando viene confrontato con il miR-34a (Tab sotto, Fig 86 e Tab 30.).

Gene name	Sequence alignment between the target mRNA (upper sequence) and miR-34 (lower sequence)	miR-34 species ^a	Expected biological effect after miR-34-mediated repression
<i>Direct miR-34 targets^b</i>			
<i>Bcl-2</i>	5'-UCGAAUCAGCUAUUUACUGCCA-3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGACCGU-5'	miR-34a	Apoptosis
<i>CCND1</i>	5'-UUUACAAGUCAUAUACUGCCA-3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGACCGU-5'	miR-34a	G ₁ -arrest
<i>CCNE2</i>	5'-CAAUUCACAAGUUAACUGCCA-3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGACCGU-5'	miR-34a (miR-34b, miR-34c)	G ₁ -arrest
<i>CDK4</i>	5'-GUGAGCAAUGGAGUGGUGCCA-3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGACCGU-5'	miR-34a (miR-34b, miR-34c)	G ₁ -arrest
<i>CDK6</i>	5'-UAUAAUAUAUAUUGACUGCCA-3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGACCGU-5'	miR-34a miR-34b	G ₁ -arrest
<i>CREB</i>	5'-UUUUCUAUGCGCAAAACUGCCU-3' 3'-GUUAGUCGAUUAUUGACCGU-5'	miR-34b	Inhibition of proliferation
<i>DLL1</i>	5'-CCGGCCGCGUGCGGACUGCCU-3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGACCGU-5'	miR-34a	Influence on Notch signaling
<i>E2F3</i>	5'-AAUUAUUUUGAAACACUGCCA-3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGACCGU-5'	miR-34a miR-34c	Inhibition of proliferation, senescence
<i>MET</i>	5'-UCCAAUGGUUUUUCACUGCCU-3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGACCGU-5'	miR-34a miR-34b miR-34c	G ₁ -arrest, inhibition of invasion and migration
<i>c-MYC</i>	5'-UUAGCCAUAAUGUAAACUGCCU-3' 3'-GUUAGUCGAUUAUUGACCGU-5'	miR-34b miR-34c	G ₁ -arrest
<i>N-MYC</i>	5'-CAAAACUGGACAGUCACUGCCA-3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGACCGU-5'	miR-34a	G ₁ -arrest
<i>SIRT1</i>	5'-CCAGCUAGGACCAUACUGCCA-3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGACCGU-5'	miR-34a	Increased p53 acetylation and activation (positive feedback loop)
<i>Genes downregulated after ectopic miR-34 expression^f</i>			
<i>CAV1</i>	5'-GAACCAACACCCUACACUGCCU-3' 3'-GUUAGUCGAUUAUUGACCGU-5'	miR-34b, miR-34c	Inhibition of migration
<i>CDC25C</i>	5'-AAGUACCAAAAGACACUGCAG-3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGACCGU-5'	miR-34a	G ₂ -arrest
<i>E2F5</i>	5'-UUGUCUUAUUAUUUACUGCCA-3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGACCGU-5'	miR-34a	Transcriptional activation
<i>HDMX</i>	5'-CCACUGCACUUGGCACUGCCA-3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGACCGU-5'	miR-34a	Increased p53 activity
<i>HMGA2</i>	5'-UUGAAGGAGAGAGACACUGCAG-3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGACCGU-5'	miR-34a	Inhibition of proliferation, senescence
<i>MYB</i>	5'-UAUGACGUGUACUACUGCCU-3' 3'-GUUAGUCGAUUAUUGACCGU-5'	miR-34b, miR-34c	Inhibition of proliferation
<i>Notch1</i>	5'-AUUUUACACAGAAACACUGCCU-3' 3'-UGUUGGUCGAUUCUGACCGU-5'	miR-34a	Inhibition of proliferation, apoptosis
<i>SFRS2</i>	5'-GUGCAGCCAUUACACACACCCU-3' 3'-GUUAGUCGAUUAUUGACCGU-5'	miR-34b, miR-34c	Influence on miRNA metabolism

Tabella 30 Target dei miR-34

L'induzione dei geni miR-34 permette a p53 di regolare l'espressione di un grande numero di proteine, anche dopo che il loro trascritto è stato sintetizzato; questo tipo di regolazione è

vantaggiosa nelle situazioni di stress cellulare, infatti non richiede la traduzione di proteine effettrici che impiegherebbero troppo tempo per riparare al danno subito dalla cellula, e facilita la simultanea regolazione di numerosi processi indotti da p53 [386]. Il targeting degli mRNA indotto da p53 attraverso i miR-34 può contribuire a creare un feedback negativo per prevenire un'incontrollata, irreversibile risposta all'attivazione di p53 [387]. Il blocco del ciclo cellulare, dei processi di senescenza e dell'apoptosi sono meccanismi coinvolti nella tumorigenesi e rappresenta un sistema di selezione positiva che consente alle cellule tumorali di evadere i principali meccanismi oncosoppressivi.

Mutazioni inattivanti p53, l'espressione di inibitori virali di p53 e mutazioni o inattivazioni epigenetiche a carico dei geni codificanti per i miR-34 sono causa dell'inattivazione permanente dei membri della famiglia miR-34 che possono, quindi, ritrovarsi downregolati a livello delle cellule tumorali

L'alterazione dell'espressione dei miR-34 è, di conseguenza, un aspetto fortemente connesso alla perdita dei meccanismi di controllo cellulari della proliferazione e pertanto correlato alla progressione neoplastica [381].

La ridotta o assente espressione del miR-34a è stata riportata nelle linee cellulari provenienti dal carcinoma pancreatico [217,382,388], dal carcinoma prostatico [382], da tumori della vescica [382], dal tumore della mammella [382,389] e dal melanoma [382]; quindi la downregolazione dell'espressione del miR-34a è una caratteristica comune delle linee cellulari derivanti da diversi tipi di tumore [382]. Una downregolazione del miR-34a è stata trovata anche nel tumore del colon [277], nel neuroblastoma primario [390], nei tessuti tumorali epiteliali ovarici [377] e nei tessuti di pazienti affetti da NSCLC, dove la sua espressione downregolata è correlata con una probabilità più alta di recidive [391].

In particolare, la riespressione del miR-34a nei tumori primari e nelle cellule tumorali causa apoptosi, o arresto del ciclo cellulare, con gli stessi effetti di p53 [215,217,277,342,379,390], poiché ha come target alcuni mRNA che regolano la progressione del ciclo cellulare (*E2F3*) e dell'apoptosi (*BCL2*) [215,380,390].

Nella maggior parte degli studi non è stata ancora trovata una correlazione tra la downregolazione/perdita di espressione del miR-34a e le mutazioni di p53 o le delezioni della regione cromosomica dov'è localizzato il miR-34a (1p36) [390,392], ad esclusione del lavoro di Gallardo et al, gli autori hanno evidenziato pazienti affetti da NSCLC portatori sia di mutazioni in p53 che di bassi livelli di miR-34a una correlazione con un aumento del rischio di recidive [391].

Anche Zenz et al e Mraz et al, in due lavori distinti, hanno osservato che l'espressione dei miR-34a è ridotta nella CLL; questa condizione è associata alle mutazioni di p53, alla chemioresistenza, ad una diminuzione della risposta al DNA danneggiato e ad una diminuzione dell'apoptosi [393,394.]. Questo implica che la misura dell'espressione del miR-34a può essere usata per predire la risposta alla terapia antitumorale. Infatti, il ripristino dell'attività del miR-34a può essere utile per prevenire la resistenza alla chemioterapia. Dopo la somministrazione di inibitori dell' MDM2, Nutlin-3, nei fibroblasti diploidi umani, è stata osservata una senescenza indotta del miR-34a e dal miR-34b/c [395]. Nelle cellule tumorali esprimenti p53 wild-type, attraverso Nutlin-3 si ha l'induzione dell'espressione dei miR-34, causando l'apoptosi.

Per quanto riguarda il miR-34b*/c questo risulta downespresso nel 72% dei carcinomi ovarici epiteliali con p53 mutato; inoltre la sua espressione risulta essere significativamente ridotta nei tumori di stadio IV rispetto a quelli di III stadio ($p=0.0171$ e $p=0.0029$ rispettivamente) [377]. I membri della famiglia dei miR-34 possono indurre un blocco della crescita simile alla senescenza quando sono overespressi nelle cellule; questo meccanismo viene indotto soprattutto dal miR-34c[215]. Il miR-34c inibisce Myc in risposta al DNA danneggiato prevenendo la progression in fase S del ciclo cellulare; così il miR-34c, reprimendo Myc, evita la sintesi continua del DNA e la proliferazione in presenza di DNA danneggiato [396]. Per esempio, l'oncogene Ras necessita alti livelli di Myc per superare la senescenza e indurre la trasformazione cellulare [397]. La perdita del meccanismo di inibizione di Myc, da parte del miR-34c in risposta ad un danno al DNA può permettere di superare il blocco della crescita e causare una proliferazione incontrollata e instabilità genomica [398]. In un modello murino con adenocarcinoma duttale pancreatico (PDAC), un'iniziale mutazione attivante di KRAS causa senescenza, tuttavia, una seconda mutazione in p53 permette di superare il blocco della crescita e induce la progressione cellulare a PDAC [399]. La mutazione di p53 induce l'espressione di una proteina stabile capace di avere una funzione da dominante negativo [400]; poichè il miR-34c è un gene target di p53, è stato considerato che mutazioni di p53 possono inibire il miR-34c, causando una upregolazione di Myc, superando lo stato di senescenza. Diversamente dalla completa perdita di p53, mutazioni di p53 che inducono l'acquisizione della sua funzione promuovono l'invasività e la meta statizzazione [401]. Mentre l'ipermetilazione del promotore del miR-34b/c è stata ben documentata nelle cellule tumorali metastatiche (Tab. 31), la funzione di questo dominante negativo di p53 mutato nei PDAC può essere un meccanismo alternativo per sopprimere l'espressione del miR-34b/c.

Cancer type	Family member	Up/downregulation (compared to normal tissue)	% of primary tumors (if known)	Biological function
Colorectal cancer	miR-34b, miR-34c	Down, Hyper-methylated	90%	Inhibition of cell growth
High grade serous ovarian carcinomas	miR-34c	Down, Unkown mechanism	Unknown	Low Expression correlates with poor survival
Osteosarcoma	miR-34a, miR-34b, miR-34c	Down, Small degree of loss of heterzygosity, small degree of methylation	~20%	Increase in G_{1v} promotes apoptosis
Colon, melanoma, head and neck, lung, breast	miR-34b, miR-34c	Down, Hypermethylated	60% methylated in metastatic primary tumors versus 40% methylated in non-metastatic primary tumors	Inhibition of cell migration
Prostate	miR-34a	Down, Hypermethylation	79.1%	Increase in G_{1v} promotes apoptosis
Neuroblastoma	miR-34a	Down, Deletion of 1p36.23	~30%	Promotes apoptosis
Epithelial Ovarian cancer	miR-34a, miR-34b, miR-34c	Down, Hypermethylation and copy number changes	miR-34a 100% and miR-34b/c 72% in cases with p53 mutation. miR-34b/c reduced in advanced tumors	Decrease proliferation and invasion in cells with p53 mutation
Breast, lung	miR-34b, miR-34c	Deletion of 11q23-q24	~48%	Unknown

Tabella 31 Ipermetilazione dei miR-34 in diversi tumori

Myc è coinvolto nelle metastasi [402] e recentemente è stato correlato con l'attivazione del miR-9, un miRNA pro-metastatico [403], quindi è possibile che il miR-34c agisca a monte del miR-9 attraverso la repressione di Myc. Secondo questa ipotesi il miR-34c potrebbe avere un ruolo chiave nel prevenire la trasformazione oncogenica e la metastatizzazione reprimendo la traduzione di Myc (Fig. 88) [398].

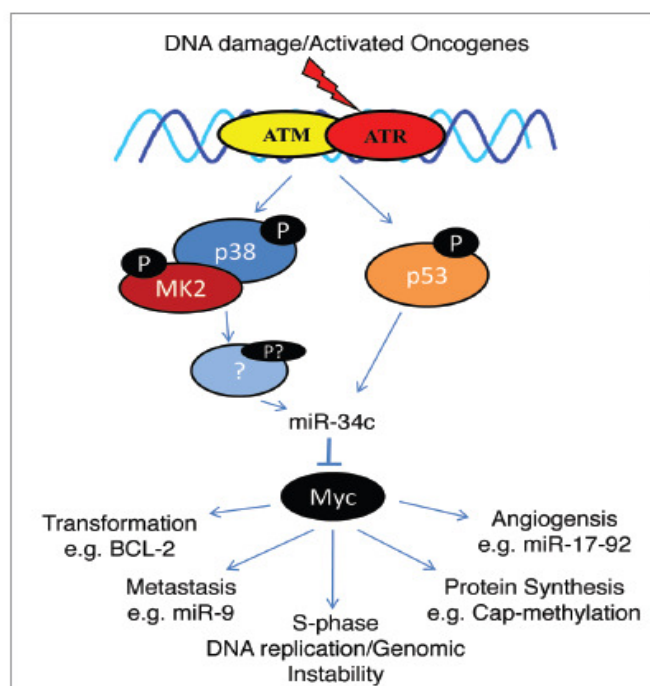


Figura 88 Il pathway tra il miR-34c e Myc e le loro funzioni biologiche

Recentemente, in diversi studi è stato dimostrato che i miR-34 possono essere silenziati in diversi tipi di tumore a causa dell'alterata metilazione del loro promotore; uno di questi è il miR-34a, frequentemente silenziato a causa di un'alterata metilazione nell' isola CpG; quest'isola è situata tra la 100a e la 500a bp a monte della sequenza di inizio del trascritto del miR-34a, che include il sito di legame per p53 [382]. L'ipermetilazione del miR-34a è stata osservata in diverse linee cellulari, come quelle di mammella, di polmone, di colon, di rene, di vescica, di pancreas, nelle linee cellulari e nel tessuto primario di melanoma e nel tessuto primario di carcinoma prostatico [382]. In particolare, la riespressione del miR-34a nelle linee cellulari di prostata e di pancreas dopo il loro trattamento con gli inibitori delle DNMT (5-AZA-2'dC) e inibitori delle HDAC (TSA) ha indotto la senescenza e il blocco del ciclo cellulare attraverso il target di *CDK6* [382].

Nelle cellule tumorali di colon il miR-34a promuove l'espressione di PUMA p53-dipendente (una proteina pro-apoptotica) e l'apoptosi, attraverso il targeting di SIRT1, un'enzima responsabile della deacetilazione e dell'inattivazione di p53, ma anche incrementando i livelli di acetilazione di p53 [404]. L'effetto pro-apoptotico del miR-34a può essere osservato solo nelle cellule tumorali di colon con p53 wild-type, indicando che il miR-34a promuove l'apoptosi attraverso la cascata SIRT1-p53-PUMA [404]; il miR-34a può anche ridurre l'espressione di Bcl2, sensibilizzando le cellule tumorali di colon al 5-fluorouracile [405]. Tuttavia in letteratura esistono evidenze contrarie sul ruolo pro-apoptotico del miR-34a; è stato dimostrato che il miR-34a può cooperare con p21 e 14-3-3 per annullare il segnale apoptotico generato dall'attivazione di p53 [406].

In un lavoro di Toyota et al è stato osservato che il miR-34b e il miR-34c sono epigeneticamente silenziati nelle linee cellulari di CRC, causando la downregolazione del miR-34b/c dovuta all'ipermetilazione delle isole CpG del loro promotore; trattando queste linee cellulari con la 5-aza-2'dC si ripristina rapidamente l'espressione del miR-34b/c [344]. Il lavoro di Toyota ha messo in evidenza che il miR-34 è inserito all'interno di un'isola CpG, e quest'isola contiene il promotore del mir-34b/c; è un promotore bidirezionale che regola l'espressione sia del miR-34b/c che del B-cell traslocation gene 4 (*BTG4*), quindi ipermetilazione di quest'isola CpG causa il silenziamento genico trascrizionale anche di *BTG4* (Fig. 89).

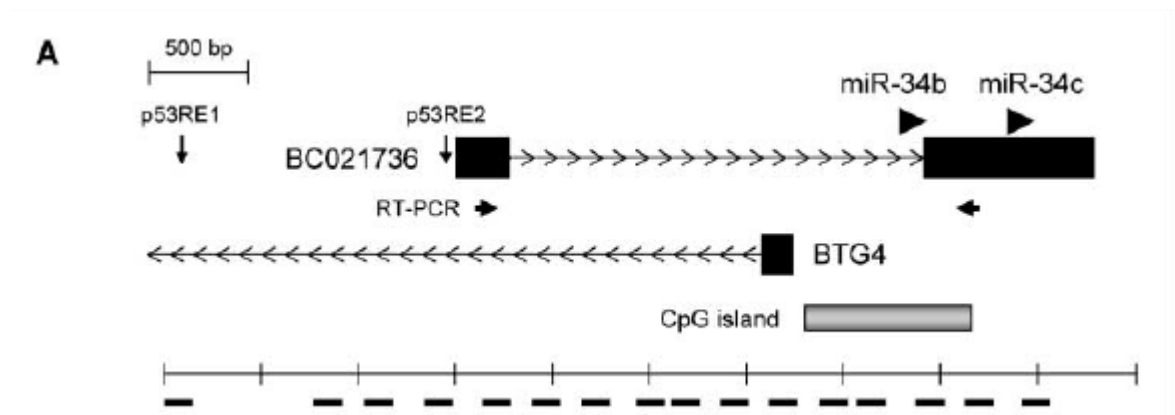


Figura 89 struttura del gene di miR34b/c e modificazione istonica; BTG4 è trascritto in direzione opposta del miR-34b/c

E' stato osservato che l'espressione ectopica di BTG4 sopprime la formazione di colonie nelle cellule CRC, suggerendo che il miR-34b/c e BTG4 siano nuovi oncosoppressori nel CRC e la metilazione bidirezionale di questi 2 geni sia un target frequentemente metilato nel CRC, visto che nel 90% dei tessuti CRC risultano metilati mentre le corrispettive mucose sane non lo sono [344].

12.5 MiR-9 e il suo coinvolgimento in diverse patologie

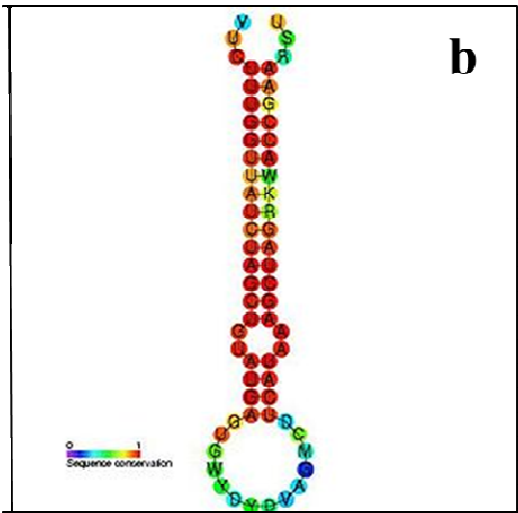


Figura 90 miR-9-1

La famiglia del *miR-9* umano è costituita da tre loci genomici: il miR-9-1, localizzato sul cromosoma 1q22 (Fig. 90, 91), il miR-9-2 localizzato sul cromosoma 5q14.3 (Fig. 92) e il miR-9-3 localizzato sul cromosoma 15q26.1 (Fig. 93). Mentre il miR-9-1 è localizzato ad una distanza di 183bp dall'isola CpG, il mir-9-3 si trova all'interno di un isola CpG e il miR-9-2 è localizzato a più di 1000 bp dall'isola CpG [407].



a

Stem-loop sequence MI0000466

Accession	MI0000466
ID	hsa-mir-9-1
Symbol	HGNC:MIR9-1
Description	Homo sapiens miR-9-1 stem-loop
Stem-loop	<pre>c guug uc g u ug ggggguug uua uuugguuaucauagcu uaugag gg u g ccccaau aa aagccaauagaucga auacuu cu g a -aaa ga a - ga</pre>

[Get sequence](#)

b

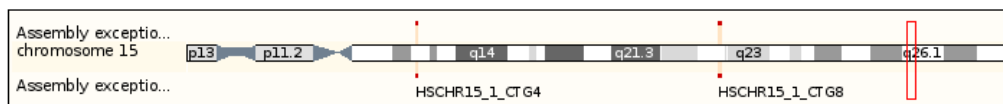
Figura 91 a: miR-9-1: localizzazione cromosomica
b: pre-miR-9-1: in rosa le sequenze mature



c

Stem-loop sequence MI0000467	
Accession	MI0000467
ID	hsa-mir-9-2
Symbol	HGNC:MIR9-2
Description	Homo sapiens miR-9-2 stem-loop
Stem-loop	<pre> g c g uc g ug a gaag gaguu uua uuuggguuaucauagcu uaugag u u cuuc cucaa aa u aagccaauagaucga aua cuu g u a - a ga a cu g </pre>
	Get sequence

Figura 92 c: miR-9-2: localizzazione cromosomica
d: pre-miR-9-2: in rosa le sequenze mature



e

Stem-loop sequence MI0000468	
Accession	MI0000468
ID	hsa-mir-9-3
Symbol	HGNC:MIR9-3
Description	Homo sapiens miR-9-3 stem-loop
Stem-loop	<pre> g cc - c g gu ca gagg cguuucu cu uuuggguuaucauagcu uaugag gc c cucu guaaaga ga aagccaauagaucga aua cu cg a a ua u - a gc ag </pre>
	Get sequence

f

Figura 93 e: miR-9-3: localizzazione cromosomica
f: pre-miR-9-3: in rosa le sequenze mature

Mature sequence MIMAT0000441	
Accession	MIMAT0000441
ID	hsa-miR-9
Sequence	16 - ucuuuggguuaucauagcuguauga - 38

Fig. 94 Sia il miR-9-1, -9-2, -9-3 hanno la stessa sequenza matura

Secondo il lavoro di Bandres et al. il miR-9 risulta essere uno dei 5 miRNA (miR-124, miR-129, miR-137, miR-149) downregolati nei CRC primari rispetto alle corrispettive mucose sane e localizzati all'interno o vicino a isole CpG; il trattamento con gli inibitori delle DNMT (5-Aza-

2'-dC) e con gli inibitori delle HDAC (PBA) ripristinano l'espressione di 3 dei 5 miRNA, tra cui il miR-9, il miR-129 e il miR-137, in 3 linee cellulari di CRC [407].

L'espressione del miR-9 è inversamente correlata con la metilazione della regione del suo promotore, infatti è stata osservata la metilazione del miR-9-1 nelle linee cellulari di CRC e nel tumore primario CRC, ma non nella corrispettiva mucosa sana.; tuttavia, la metilazione del miR-9-1 è stata associata anche alla presenza di metastasi ai linfonodi [407].

Il miR-9 insieme ad altri 3 miRNA (let-7, miR-125, miR-30) sono capaci di reprimere l'espressione di *LIN28* nelle cellule staminali embrionali (ES) e nelle cellule tumorali [408]. *LIN28* è una proteina legante RNA altamente conservata durante l'evoluzione (un omologo del gene *lin-28* di *C. elegans*) [409,410]; questa proteina insieme a *OCT4*, *SOX2* e *NANOG* sono capaci di riprogrammare le cellule somatiche, producendo cellule staminali pluripotenti indotte (iPS) [411]. L'espressione di *LIN28* è fortemente ristretta alle ES così come durante lo sviluppo dei tessuti e la sua espressione diminuisce durante il processo di differenziazione [410,412,413,414,415,416,417,418]; nei tumori umani è up-regolata e funziona come promotore della trasformazione maligna e della progressione del tumore [419,420,421,422,423,424,425,426]. Quindi la downregolazione di questi miRNA potrebbe essere uno dei meccanismi con cui viene riattivata *LIN28* nei tumori umani [408].

In un altro studio è stato osservato che la downregolazione del miR-9* sembra discriminare specificatamente un particolare sottogruppo di pazienti affetti da Linfoma di Burkitt, in particolare quelli senza la traslocazione di *MYC*; ed è stato dimostrato che il miR-9* è capace di modulare l'espressione di *E2F1* e di *c-Myc*. In tutti questi casi è stato osservato che il miR-9-1 è fortemente metilato [427].

Nelle cellule tumorali di mammella il mir-9 risulta essere upregolato; ha come target diretto *CDH1* codificante per la molecola di adesione delle cellule epiteliali E-caderina, una glicoproteina transmembrana che forma il core delle giunzioni aderenti tra le cellule epiteliali adiacenti [428]. Il silenziamento di *CDH1*, ad opera del mir-9, causa un incremento della motilità cellulare e dell'invasività; infatti il miR-9 media la downregolazione dell'E-caderina inducendo l'attivazione del signaling della B-catenina, che contribuisce ad upregolare l'espressione del gene encoding vascular endothelial growth factor (VEGF), incrementando l'angiogenesi tumorale. Mentre l'overespressione del miR-9 nelle cellule tumorali della mammella non metastatiche permette a queste cellule di formare micrometastasi polmonari nel topo, l'inibizione del mR-9 attraverso l'uso di "miRNA sponge" nelle cellule tumorali estremamente maligne inibisce la formazione di metastasi. L'espressione del miR-9 è attivata da *MYC* e *MYCN*, entrambi si legano direttamente al locus del miR-9-3; nei tumori umani, i livelli

del miR-9 correlano con l'amplificazione di *MYCN* con il grado del tumore e con lo status metastatico [403].

Nel tumore della cervice uterina il miR-9 e il miR-200 sono in grado di predire la sopravvivenza nei pazienti; secondo questo studio, questi 2 miRNA potrebbero avere un ruolo regolatorio importante nel controllo del tumore alla cervice, soprattutto il miR-200 che probabilmente ha degli effetti sul processo metastatico attraverso l'inibizione di diversi geni che controllano la motilità cellulare [429].

Nell'adenocarcinoma gastrico, il miR-9 è downregolato; la sua overespressione sopprime la crescita delle linee cellulari di adenocarcinoma gastrico (MGC803), così come nei tumori xenograft derivanti da queste cellule nei topi SCID. Da analisi bioinformatiche è stato possibile predire i geni target, tra cui l'oncogene NF-κB1, il cui 3'UTR dell'mRNA contiene un sito di legame per il miR-9. Attraverso un sistema enhanced green fluorescence protein gene reporter (EGFP-NF-κB1 3'UTR), è stato possibile valutare che l'overespressione del miR-9 causa una downregolazione di NF-κB1 e quindi una diminuzione dell'intensità dell'EGFP; mentre mutazioni di NF-κB1 a carico del sito di legame per il miR-9 inibiscono la regolazione indotta dal miR-9 su NF-κB1 e quindi l'intensità del segnale di EGFP rimane invariata; quindi i livelli del mRNA di NF-κB1 e della sua proteina dipendono dal miR-9. Il knockdown di NF-κB1 inibisce la crescita cellulare delle MGC803 in maniera tempo-dipendente, mentre l'espressione ectopica di NF-κB1 può rimuovere l'inibizione della crescita delle cellule MGC803 causata da miR-9. Quindi il target del miR-9, NF-κB1, regola la crescita cellulare nel tumore gastrico, suggerendo invece che il miR-9 ha un'attività oncosoppressiva nella patogenesi di questo tumore [430].

Nei tumori endometriali l'oncosoppressore FOXO1 è downregolato rispetto all'endometrio normale, attraverso alcuni algoritmi in grado di predire i target, sono stati identificati diversi miRNA che potenzialmente si possono legare al 3'UTR del trascritto di FOXO1, suggerendo che l'espressione di FOXO1 nel tumore endometriale può essere mediata da miRNA. Per determinare il ruolo dei miRNA sono state usate 2 linee cellulari endometriali, le HEC-1B e Ishakawa, che esprimono FOXO1 rispettivamente ad alti e bassi livelli. L'espressione dei miR-9, miR-27, miR-96, miR-153, miR-182, miR-183 e miR-186 nelle HEC-1B è sufficiente a ridurre la quantità di FOXO1; contrariamente, l'espressione di FOXO1 è stata ripristinata nelle linee cellulari Ishakawa attraverso la simultanea inibizione dei miR-9, miR-27, miR-96, miR-153, miR-182, miR-183 e miR-186, ma è accompagnata dal blocco del ciclo cellulare in G1 e morte cellulare. Poiché diversi miRNA overespressi nel tumore endometriale possono reprimere l'espressione di FOXO1, l'alterata espressione di questi miRNA può causare un'alterazione nel

controllo del ciclo cellulare e una diminuzione della risposta all'apoptosi inducendo così la tumorigenesi endometriale [431].

In uno studio sul carcinoma a cellule uroteliali (UCC) è stato analizzato il ruolo dell'ipermetilazione delle isole CpG e delle sponde (regioni a bassa densità di nucleotidi CpG, adiacenti alle isole CpG) nella regolazione dell'espressione di miRNA e mirtroni (miRNA trascritti da piccoli introni e processati indipendentemente da Drosha); sono stati identificati 4 mirtroni e 16 miRNA con CpG ipermetilate tra tessuto tumorale e mucosa sana. Per diversi miRNA, l'ipermetilazione è più frequente nelle sponde CpG rispetto alle isole (come per esempio per il miR-9, -149, -210, -212, -328, -503, -1224, -1227, -1229) ed è associata con il grado del tumore, con lo stadio e la prognosi; il silenziamento epigenetico di alcuni miRNA è associato con la presenza di UCC [432].

Nel carcinoma fibrolamellare (FLC), una rara variante del carcinoma epatocellulare (HCC), è stata osservata un'ipermetilazione dei geni della ciclina D2 (19%) e RASSF1A (38%) così come nei geni dei miR-9-1 (13%) e miR-9-2 (23%); rispetto al HCC, i geni di APC e CDH1 (E-caderina) sono stati trovati non metilati negli FLC, mentre GSTP1 ha un moderato livello di metilazione simile tra il tessuto tumorale e il tessuto circostante. Mentre nell'HCC senza cirrosi si ha una significativa riduzione dei livelli di metilazione globale, nell'FLC non si è evidenziato nessuna ipometilazione [433].

13. OBIETTIVO DELLO STUDIO

L'analisi dei meccanismi di regolazione epigenetici quali la metilazione e l'acetilazione degli istoni ha assunto un ruolo preponderante nell'identificazione di "nuovi" marker tumorali.

L'obiettivo di questo studio è stato la messa a punto di una tecnica quantitativa per il dosaggio della metilazione tramite l'analisi di High Resolution Melt, basata sulle modifiche del profilo di melting che intervengono in campioni di DNA diversamente metilato.

Lo studio si è rivolto alla standardizzazione dei protocolli, alla verifica della loro fattibilità, agli studi di linearità e di sensibilità. Sono state analizzate variabili come l'influenza del numero di CpG nel determinare le performances del dosaggio. I metodi di misura della metilazione di due specifici microRNA (miR-34b/c e miR-9-1) sono stati applicati su campioni di DNA appartenenti a tessuti tumorali colon-rettali e alle corrispettive mucose sane. Allo scopo di verificare il valore dei risultati ottenuti, è stata successivamente eseguita sugli stessi campioni la valutazione del livello di espressione tramite metodo TaqMan.

14. MATERIALI E METODI

14.1 Campioni di Tessuto

Per questo studio sono stati utilizzati campioni di tessuto appartenenti a 80 pazienti affetti da carcinoma del colon-retto. Per ogni paziente avevamo a disposizione sia il frammento bioptico tumorale che la corrispondente mucosa sana.

Tutti i campioni, conservati in *RNAlater*TM (QIAGEN), sono stati congelati a -80°C fino al momento dell'analisi.

Per eseguire l'estrazione di DNA è stato utilizzato il QIAcube (QIAGEN) secondo il Tissue Protocol del QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN).

Per l'estrazione dei microRNA, abbiamo utilizzato il *mirVana*TM miRNA Isolation Kit (Ambion, Austin, TX, USA), seguendo le indicazioni del protocollo.

Le concentrazioni di miRNA e DNA sono state determinate tramite l'utilizzo di Nanodrop[®] ND-1000 Spectrophotometer.

Il tipo istologico e il grado di differenziazione sono stati valutati secondo i criteri stabiliti dall'organizzazione mondiale della sanità (WHO) [221] e secondo la classificazione TNM [222].

14.2 Campioni di Controllo Full Methylated e UnMethylated

E' stato raccolto un pool di 20 ml di liquido spermatico, proveniente da diversi volontari da cui avevamo ottenuto il consenso informato, in una falcon da 50 ml, da cui poi è stato estratto il DNA attraverso il metodo Fenolo-Chloroformio. La valutazione della quantità e della purezza del DNA ottenuto sono state valutate tramite spettrofotometro "NanoDrop" e conservato a -80°C.

Questo campione è stato utilizzato come controllo negativo per la valutazione dei livelli di metilazione in quanto è noto da letteratura che lo sperma è tipicamente "non metilato" detto UNMETHYLATED (U, cioè 0% metilato) [434]. Come campione di controllo positivo FULL METHYLATED (M, cioè 100% metilato) è stato utilizzato l'Universal Methylated DNA (CHEMICON INTERNATIONAL).

14.3 Trattamento con Bisolfito di Sodio

Molti dei metodi utilizzati per determinare lo stato di metilazione a livello dei siti CpG si basano sulla modificazione del DNA mediante il trattamento con bisolfito di sodio.

Questo agente porta ad una modificazione della sequenza nucleotidica del DNA in quanto le citosine non metilate vengono deaminate e quindi convertite in uracile, mentre le citosine metilate vengono lasciate inalterate (Fig. 94) [435].

Sottoponendo ad amplificazione i prodotti di DNA trattato, durante la reazione di PCR in corrispondenza di ogni uracile si avrà l'incorporazione di una timina, mentre le citosine metilate rimarranno tali. La comparsa di una timina nell'amplificato, in una specifica posizione, indica l'assenza di metilazione su questo residuo a livello del campione di DNA originario, mentre la permanenza della citosina mostra la presenza della metilazione [436].

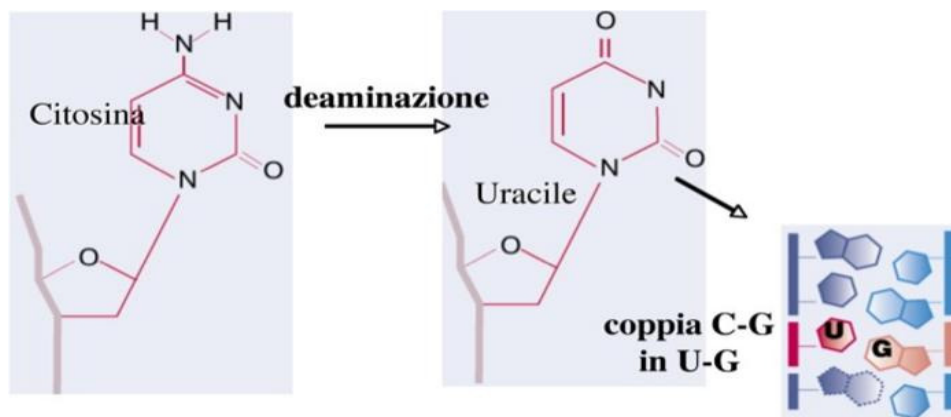


Figura 94 Deaminazione della citosina in uracile.

Questa conversione delle basi, che permette di discriminare le citosine in base alla presenza o meno del gruppo metile, si è rivelata utile per lo studio della metilazione del DNA portando dei vantaggi rispetto alla semplice amplificazione del materiale genomico tramite PCR in cui i profili di metilazione non vengono conservati nei prodotti dell'amplificazione.

In seguito alla parziale depurinazione acido-catalizzata, il trattamento con bisolfito può portare ad un'elevata degradazione del DNA e ciò può rappresentare uno svantaggio per l'impiego di questo metodo, soprattutto quando la concentrazione dei campioni di partenza è molto bassa.

Inoltre, recenti risultati hanno dimostrato che, anche quando si fa uso dei kit commerciali per il trattamento [437], si può avere una conversione incompleta delle basi che si aggira tipicamente nell'ordine del 2%. Questo non solo può condurre a falsi positivi, ma può anche

pregiudicare l'analisi quantitativa portando ad una sopravvalutazione dei livelli di metilazione [438] specialmente quando il materiale di partenza contiene bassi livelli di metilazione.

Tutti i campioni di DNA ottenuti con le precedenti estrazioni, sia per quanto riguarda controlli FULL METHYLATED (M) e UNMETHYLATED (U) che i campioni CRC e corrispettive mucose sane, sono stati sottoposti al trattamento con bisolfito di sodio.

Il trattamento con il bisolfito di sodio provoca un'alterazione della sequenza nucleotidica a livello dei siti CpG. (Fig. 95).

Prima del Trattamento con Bisolfito:

Wild-Type DNA 5'...GCGGACCGCG..

Dopo il Trattamento con Bisolfito:

DNA NON Metilato 5'...GUGGAUUGUG..

DNA Metilato 5'...GCGGAUCGCG..

Figura 95 Il trattamento con bisolfito di sodio.

L'intera procedura che porta alla conversione del DNA è eseguita con il kit Epitect Bisulfite Kit (QIAGEN) osservando il protocollo da loro fornito per il DNA a basse concentrazioni (da 1 ng a 500 ng); è composta principalmente da due fasi: una prima fase di trattamento seguita dalla successiva fase di purificazione. I campioni vengono poi conservati a -20°C.

14.4 Allestimento dei Punti Curva

Dopo esser stati sottoposti al trattamento col bisolfito, volumi diversi dei controlli FULL METHYLATED (**M**) e UNMETHYLATED (**U**) sono stati miscelati al fine d'ottenere altri campioni di controllo caratterizzati da percentuali di metilazione diverse, generando una curva di diluizione .

Tramite tale procedimento abbiamo costituito un totale di 7 punti curva:

- 100% M
- 50% M
- 25% M
- 12,5% M
- 6,25% M
- 3,125% M
- 0% M

I campioni 100% M e 0% M non sono altro che aliquote dei corrispondenti controlli FULL METHYLATED (**M**) e UNMETHYLATED (**U**); il campione 50% M è stato ottenuto miscelando eguali volumi di **M** e **U**; per il 25% M volumi uguali del 50% M e dell'**U** mentre tutti gli altri campioni derivano da diluizioni scalare 1:4 a partire dal 25% M.

14.5 Disegno dei Primers di Amplificazione e PCR

Per il disegno dei primers da utilizzare nelle reazioni di amplificazione, le sequenze relative ai due miRNA maturi sono state individuate tramite il miRBase insieme alle relative localizzazioni cromosomiche (Tab. 32).

	ACCESSION SEQUENCE (miRBase)	LOCALIZZAZIONE CROMOSOMICA
<i>miR-34b</i>	MIMAT0004676	11q23
<i>miR-34c</i>	MIMAT0000686	11q23
<i>miR-9-1</i>	MIMAT0000441	1q22

Tabella 32 Localizzazioni cromosomiche dei miRNA oggetto di studio

Successivamente, attraverso l'utilizzo di Ensembl (www.ensembl.org), sono state estrapolate le sequenze geniche codificanti per i tre microRNA (Fig.95-96).

GCTGCGAGGCCGGCGGGGGTCCCGCTGGGCCCCGGGGGTGTCTCGGGGGCCGCTTGCGCCAGCCATGGTAGGGCGT
CCCCCGGTGAAATGGGGTCCGAGGCGGGCCCCGACCCCGCTCGGCGCTGCGGACCGTCCGGGAGCTGCAGCCGCG
GGTGCCCGGTGCTCGGTTGTAGGCAGTGTATTAGCTGATTGTACTGTGGTGTTACAATCACTAACTCCACTGCCA
TCAAAACAAGGCACAGCATCACCGCCCGCCGGCCGGAAGAAGACGCCGGCTCGGGCAGCCCGCAGCCTTCGAGAG
AAGATGCCTGAGAAGCGCGGCGTCCGGCGTGGGTCTGCGCAGCCTGCCCCGCGAGCGCCCGCTGCAAGTGCGAGGA
AACCCGCGGTTTCTCCAGATACAGTTAACTGTTAGCTCTCTCTAGGAGTCACAGAAGATGAAACAGTCTCATGCCAG
GAAAGCAAAATCCCTGGAGGTGAAGCCCTCCATCCATGTAACGGTTAATACTGTATGCTGTGATTCACTGTGTCTAT
TTGCCATCGTCTAGTAGAGTATTACCAAGCTAGCAACTCAGTTGAGCTCCAACCTCAACCAATGAATTGCCTGCCTGT
CACAACGTGTTGGGGTACCAACTTGAGACTGCAATTTTTTCTATGAGTCTAGTTACTAGGCAGTGTAGTTAGCTGATT
GCTAATAGTACCAATCACTAACCACACGGCCAGGTAAAAAGATTGGGAATTCGTCCAAATGAGCTGCCTGTGCATC
ATCAATGTGCGTGGGGAAGAGGGGTGTTGGAAAATGCTGATTTTCATCCATTGCCTATTAATTGCTCAGCCAAAAGAA
AAAAATCAACATTTTCAGCTACTAAGTTTACAATGTATGTAATGTGTATGTATGTGGGGTTTGTGTTTTTTTTTTTCA
ATATTCCTTCAGG

Figura 95 Sequenze geniche codificanti il miR-34b (in verde) e il miR-34c (in viola).

```
CACGGGTCATCGCGTCCTTTCCACGCCTTTTTCGGTCTCTGTCGTGTCTGTATCTCCGTGTCTGAGGTTTTGTTGTTGT
TTGTCTCGGACTTCATTTCTCTCTTACCCTCCCCCTCAACTCCACTCGTGTCCCTTCCCTCCTACTCCCGCTGACGGGC
GACCGGGAAGCTGCGGAGGTGCTGGCGCGGGCGGGCCGGGAGGCTGCGTGGAAGAGGCGGCGACAGCAGCCAG
GAGGCGGGGTTGGTTGTTATCTTTGGTTATCTAGCTGTATGAGTGGTGTGGAGTCTTCATAAAGCTAGATAACCGAAA
GTAAAAATAACCCCA TACTGCGCAGAGGGGCCGGGAAAGCCGGCCTCACGGGCGGGAGGGAGAGGCTTGAGC
GAGGGGCTAGAGCCGCGAGGACTGACCAGCACCAGAGGATACAAGAGGAGGAGAGAGACCTCACTGGTTCGGGCG
ACATTCACCCCCCAGCACCCCAGTCGGCACAGGTAGGAGTCACAGTCCCATTCACTTCAGCCAGGTGCCATA
```

Figura 96 Sequenza genica codificante per il miR-9-1.

Attraverso il software Methyl Primer Express v1.0 è stata identificata la presenza di isole CpG in una regione del genoma posta ~2500 bp a monte delle sequenze geniche codificanti per il miR-34b/c e per il miR-9-1.

Le isole identificate sono state inserite nel software Pyro Q-CpG V 1.0.9 (Biotage) per la ricerca di primers privi di citosine metilabili.

Sono state costruite cinque coppie di primers: tre per l'amplificazione del miR-34b/c (Fig. 97) e due per l'amplificazione del miR-9-1 (Fig. 98).

```
TTAATAGAGGTTATTTAAGTTATTTTATTTGGAAAAATTAATTTATAA TTTGAGGTATTGGGAAGTCTTTTATAGGGC
GGAATGGTTACGGAAATTGGGTAGGTTGGGGGTTTTTTGGGGAATGAGGGAGTGGAGGAGTTTTTGTTTTTTTGTT
AGATTAGAAAGAGAAA CGTT TTAAGAATTGGGTTTTATT TTTAGGCGTTTTTTTGGAGGTTTTTGGGATCGTTTATAG
CGTTTTTTTAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATTTTTCGTTTCGCGTTTCGTTTCGTTTCGTTTCGTTTCGCGGGTTTTAAGGAC
GGTTGGTCGTTTCGTTATAGTTATTCGGTCGTTTAGAGCGGCGGGCGTACGGGTCGAGAGAGTTAGTTTTAGGTTTTGGGTTGG
GAATTGAAGTTTGGCGTGAAGGAAGTGGGAGTTGGGTGGAGGCGAAGGGGAAAGGAAAAGCGAGGGGAAT
TTGAGCGGGAGGTTTTGAGAGGAGCGGGAGGTTGGGAAGGGGAGGTTTGGTATTTTGGGGGTTATGGGGTTCG
GGGCGCGG
```

Figura 97. Coppie di primers relative all'amplificazione del miR-34b/c: miR34b/cmAF e miR34b/cmAR (in verde); miR34b/cmBF e miR34b/cmBR (in grigio).



Figura 98. Coppie di primers impiegate nell'amplificazione del miR-9-1: miR9-1mAF e miR9-1mAR (in viola); miR9-1mBF e miR9-1mBR (in celeste); miR9-1mCF e miR9-1mCR (in verde).

Le coppie individuate per i due microRNA differivano tra loro per la lunghezza della sequenza dei primers, per l'estensione dell'amplicone individuato e per il numero di CpG comprese nella sequenza amplificata (tab. 33 e 34).

<i>Primers</i>	<i>Lunghezza primer Forward</i>	<i>Lunghezza primer Reverse</i>	<i>Lunghezza amplicone</i>	<i>n° CpG</i>
<i>miR34b/cmA</i>	19 b	21 b	153 bp	4
<i>miR34b/cmB</i>	19 b	18 b	143 bp	8

Tabella 33. Differenze tra i primers relativi all'amplificazione del miR-34b/c.

<i>Primers</i>	<i>Lunghezza primer Forward</i>	<i>Lunghezza primer Reverse</i>	<i>Lunghezza amplicone</i>	<i>n° CpG</i>
<i>miR9-1mA</i>	19 b	23 b	146 bp	11
<i>miR9-1mB</i>	21 b	18 b	129 bp	10
<i>miR9-1mC</i>	21 b	21 b	198 bp	14

Tabella 34. Differenze tra i primers relativi all'amplificazione del miR-9-1.

Una volta disegnati i primer, i nostri campioni, i nostri controlli M e U con la corrispettiva curva di diluizione sono stati amplificati usando uno stesso protocollo di PCR (tab. 35), in un volume finale di 12,5 µl; per ogni reazione è stata utilizzato come termociclatore la MultiGene (diatech) che ci ha consentito di sottoporre i campioni a dei gradienti di temperatura in modo tale da individuare la temperatura di annealing ottimale per ogni coppia di primers. Ogni esperimento è stato condotto seguendo lo stesso protocollo di cicli termici: un primo passaggio di 10 min a 95°C, per l'attivazione dell'enzima Taq, seguito da 35 cicli per 30 sec a 95°C, 30 sec alla presunta temperatura di annealing specifica per ogni coppia di primers (Tab. 36), 30 sec a 72°C e uno step finale di elongazione di 20 min a una temperatura di 72°C.

	<i>Volume</i>	<i>Concentrazione finale</i>
<i>PCR Buffer II 10X (Applied)</i>	1,25 µl	1X
<i>MgCl₂ Solution 25mM (Applied)</i>	1,75 µl	3,5 µM
<i>dNTPs 5000 µM</i>	2 µl	800 µM
<i>Pr. Forward 10 µM</i>	0,75 µl	600 nM
<i>Pr. Revers 10 µM</i>	0,75 µl	600 nM
<i>Taq Gold (5 U/µl)</i>	0,1 µl	1U
<i>Syto9 (50 µM)</i>	0,375 µl	1,5 µM
<i>H₂O</i>	4,525 µl	
<i>DNA</i>	1 µl	

Tabella. 35. Protocollo di PCR inizialmente utilizzato per l'amplificazione della curva di diluizione.

	<i>miR9-1mC</i>	<i>miR34b/cmB</i>
<i>T_a</i>	57°C	55°C

Tabella. 36. T_a ottimali per le coppie di primers.

Sono state provate diverse coppie di primer per ciascun gene, ma sulla base dei risultati ottenuti delle analisi HRM abbiamo deciso di portare avanti il nostro lavoro utilizzando le coppie di primers miR-9-1mC e miR-34b/cmB, in quanto questi due sistemi si sono dimostrati maggiormente sensibili rispetto agli altri. Inoltre, attraverso la valutazione delle differenze tra i vari sistemi d'amplificazione (lunghezza dei primers, lunghezza dell'amplicone identificato, numero di CpG,...) abbiamo potuto concludere che la sensibilità delle varie coppie di primers fosse direttamente proporzionale al numero di CpG presenti all'interno della sequenza amplificata (Fig. 99-102).

```

TTCGTTTCGCGTTTCGTTTCGTTTCGTTTCGCGGGGTTTAAGGACGGTTGGTCGTTTCGTTATAGTTATTCGGT
CGTTTAGAGCGGCGGGGCGTACGGGGTCGAGAGAGTTAGTTTAGGGTTGGGGTTGGAATTGAAGTTTG
CGTGAAGGAAGTGGGAGTTCGGGTCGAGGAGGCGAAGGGGAAAGGAAAAGCGAGGGGAATTTGAGCGGGAGGGT
TTTGAGAGGAGCGGGAGGTTGCGGGAAGGGGAGGTTTGGTATGGGGGTCGGGGCGCGGT
TTTCGGTTTGGGAGGGCGCGGGTTTTCGGTAGCGTCGTTTCGTTGGTTAGTTACGCGTGTTGTGCGTTGCGAG
GTCGGCGGGGTTTCGTTGGGTTTCGGGGGTGTTTCGGGGGTCGTTTTCGTTATGTTAGGGCGTTTTCGG
TGAAAT

```

Figura 99 Primers utilizzati per l'amplificazione del miR-34b/c.

```

TTGGGATGCGTTTTTCGATTTTTAGAGAAGGGTAGTGGAGATTCGGCGAGGTTGGGGAGGTTTTGTTTGGGTCGTTG
CGGTTTTTCGGGTGGTACGAAAAGTTCGCGCGTTTTTTTATTGGGATTAGCGGAATTTTGTGTTTGGTTTCG
AATGGGAGAGCGGGAAATGGGGTATTAGAAATTTTTGGGTTTGGATCGGGGTTAATTTTCGATTTCGACGTTACGG
GTTATCGCGTTTTTTTACGTTTTTTTCGGTTTTTGTGCGTGTGTTGATTTTCGTGTTGAGTTTTTGTGTTGTTT
TGTTTCGGATTTATTTTTTTTTTATTTTTTTTTTAATTTATTCGTGTTTTTTTTTTTTATTTTCGTTGACGGGCGAT
CGG

```

Figura100 Primers utilizzati per l'amplificazione del miR-9-1.

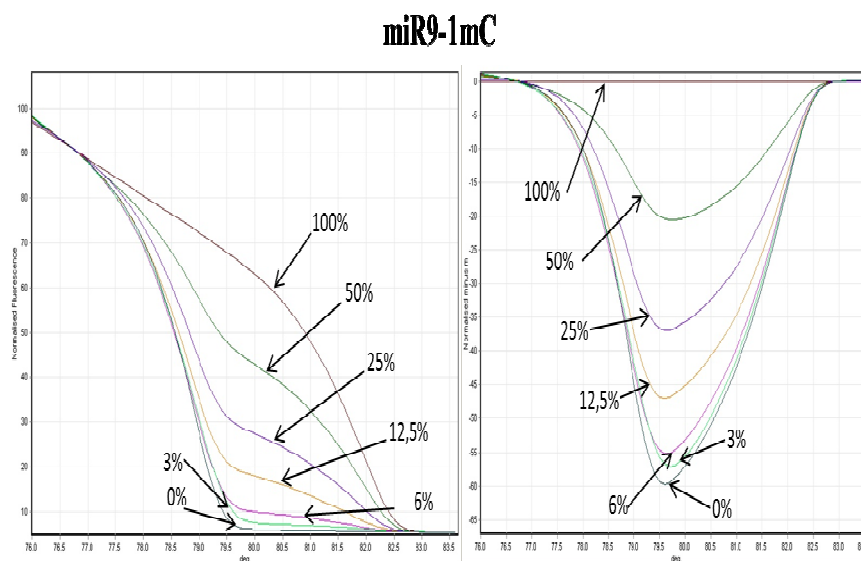


Fig 101 Grafici HRM relativi all'analisi della curva di diluizione con le coppie di primers miR9-1mC.

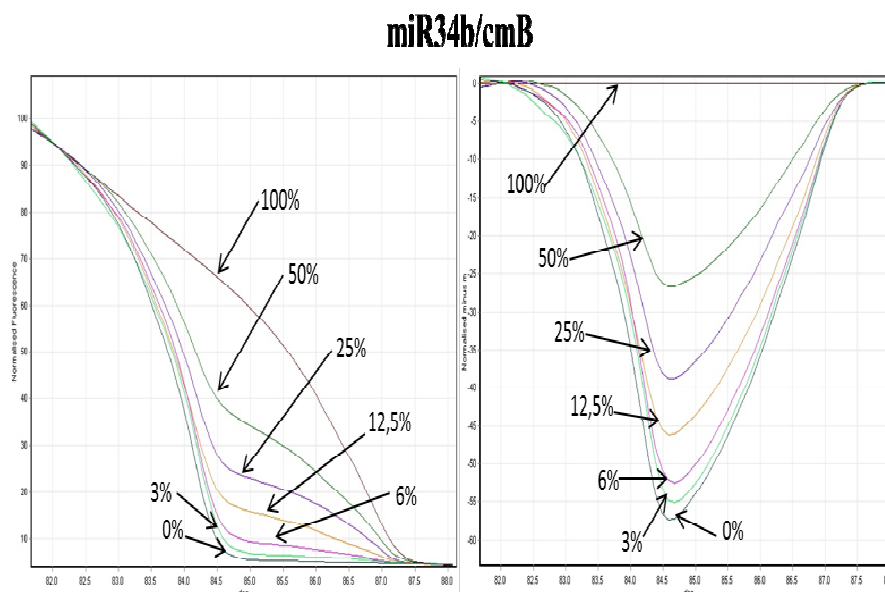


Figura 102. Grafici HRM relativi all'analisi della curva di diluizione con le coppie di primers miR34b/cmB.

Per testare la ripetibilità dei nostri sistemi sono stati in seguito eseguiti tre esperimenti d'amplificazione della curva di diluizione in tre tempi diversi utilizzando entrambe le coppie di primers miR9-1mC e miR34b/cmB (fig.103).

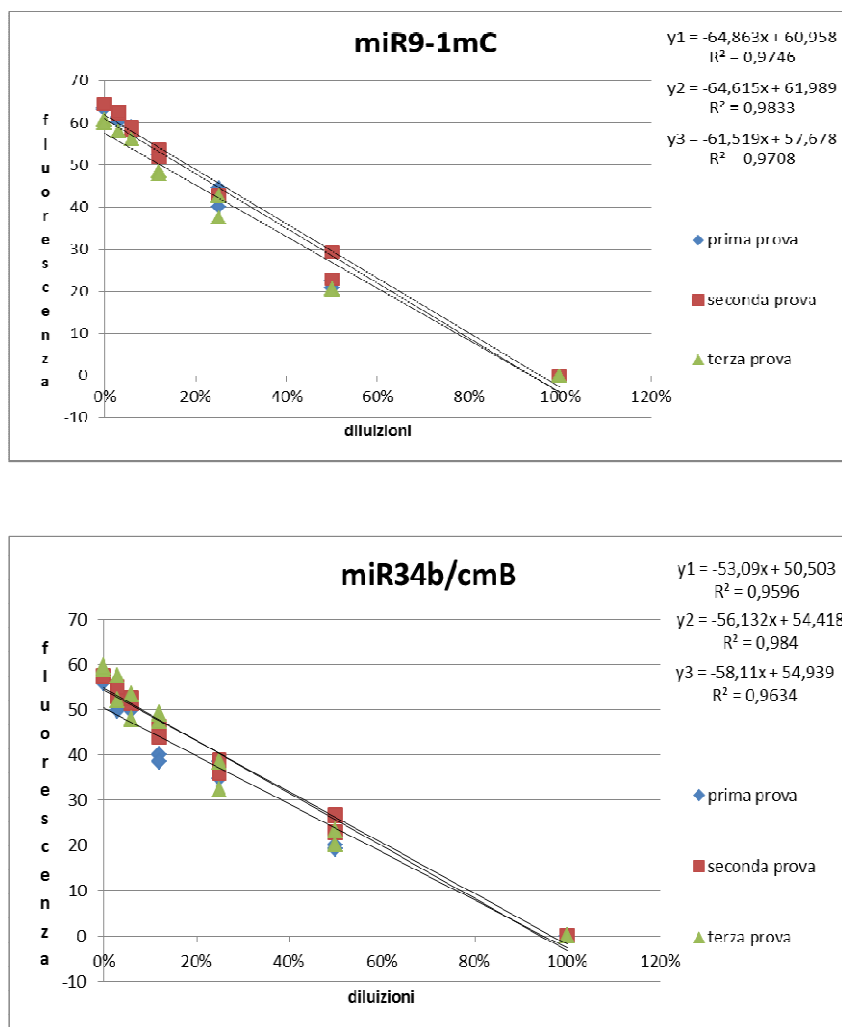


Figura 103 Elaborazione dei valori di fluorescenza in funzione delle percentuali di diluizione della curva di taratura di tre esperimenti effettuati in tempi diversi per il miR9-1mC e miR34b/cmB

Le analisi dei campioni di DNA estratti da tessuti di pazienti affetti da tumore coloretale che sono state sempre effettuate in presenza di quattro campioni appartenenti alla nostra curva di diluizione (100%M, 25%M, 6%M e 0%M).

A differenza degli esperimenti precedenti, i campioni di DNA tumorale e non, mostravano una bassa capacità d'amplificazione; per questo motivo abbiamo condotto alcune prove variando la concentrazione dei campioni (e della curva) per cercare di aumentare l'efficienza dell'analisi. Sono quindi state condotte tre prove con campioni concentrati 1:1(fig a), con campioni di DNA concentrati 2:1 (fig b) e con concentrazioni di 1:5 (fig.104c).

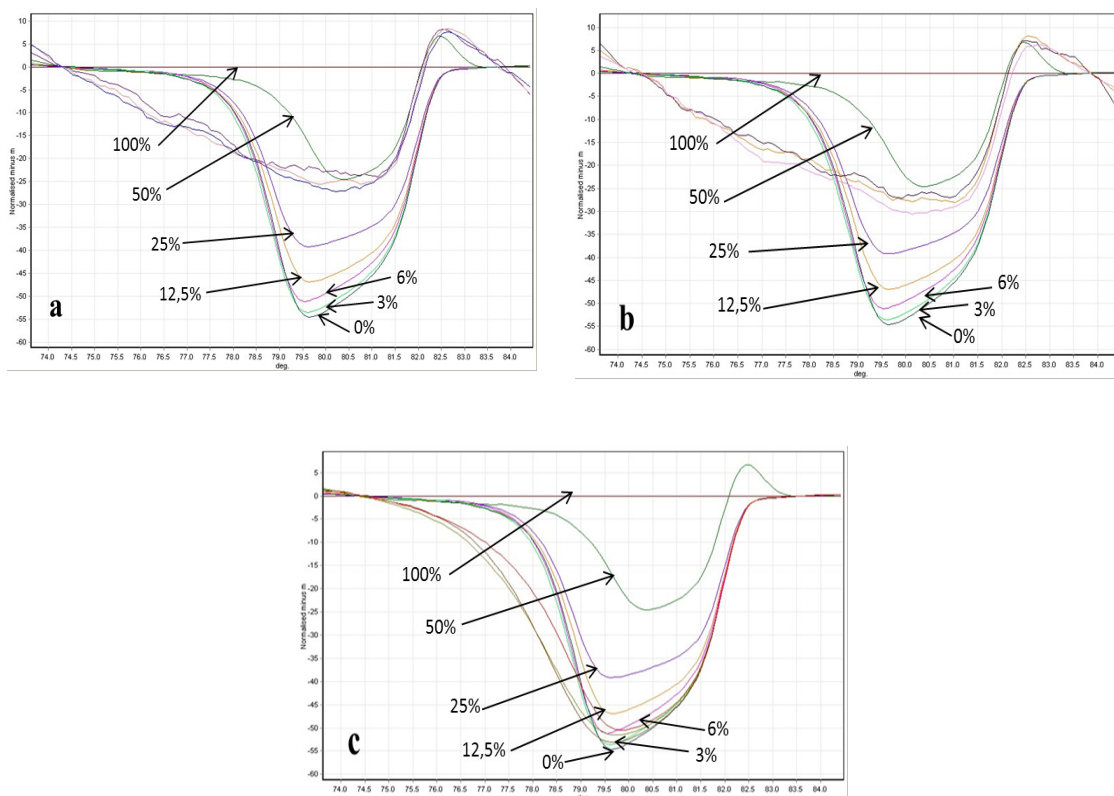


Figura 104. Analisi HRM di campioni con diverse concentrazioni di DNA

In base ai risultati ottenuti abbiamo deciso di diluire i nostri campioni e i nostri punti curva con acqua seguendo proporzioni di 1:5, dopo aver testato la riproducibilità del nostro sistema (fig. 105).

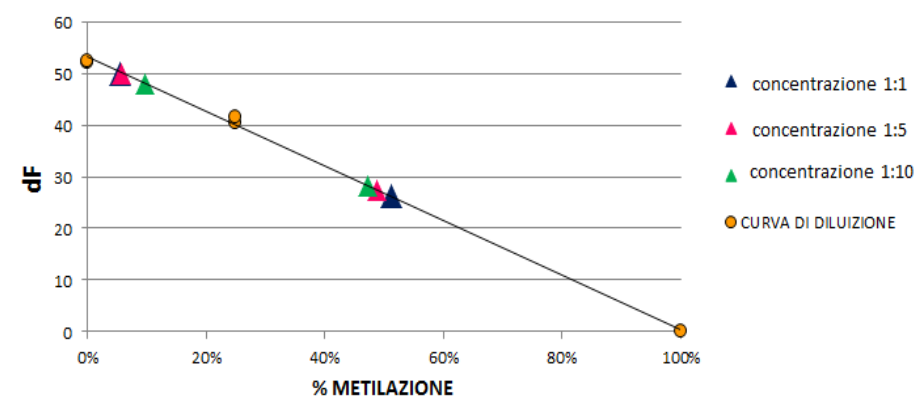


Figura 105. Dimostrazione della riproducibilità del sistema analizzando due campioni di DNA (tumorale e non tumorale) a concentrazioni diverse, all'interno dello stesso sistema di dosaggio.

Per la coppia di primers miR9-1mC il protocollo di PCR utilizzato fin dall'inizio per l'amplificazione della curva di diluizione si è dimostrato altamente efficiente anche per l'amplificazione dei campioni di DNA appartenenti ai tessuti tumorali e alle rispettive mucose

sane. Al contrario, invece le cinetiche delle curve HRM corrispondenti ai campioni di DNA amplificati con i primers miR34b/cmB mostravano degli andamenti anomali (fig. 106).

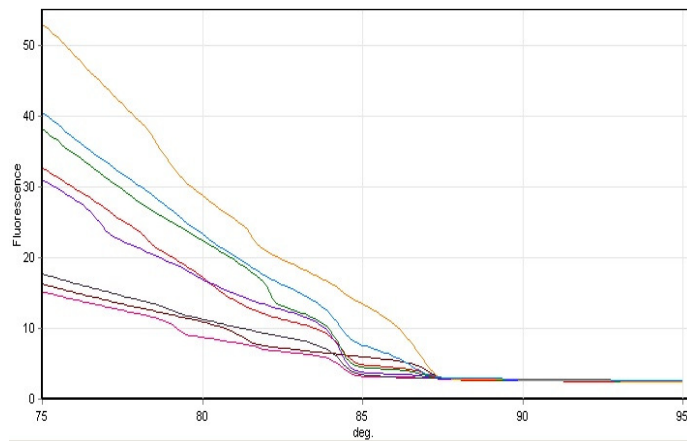
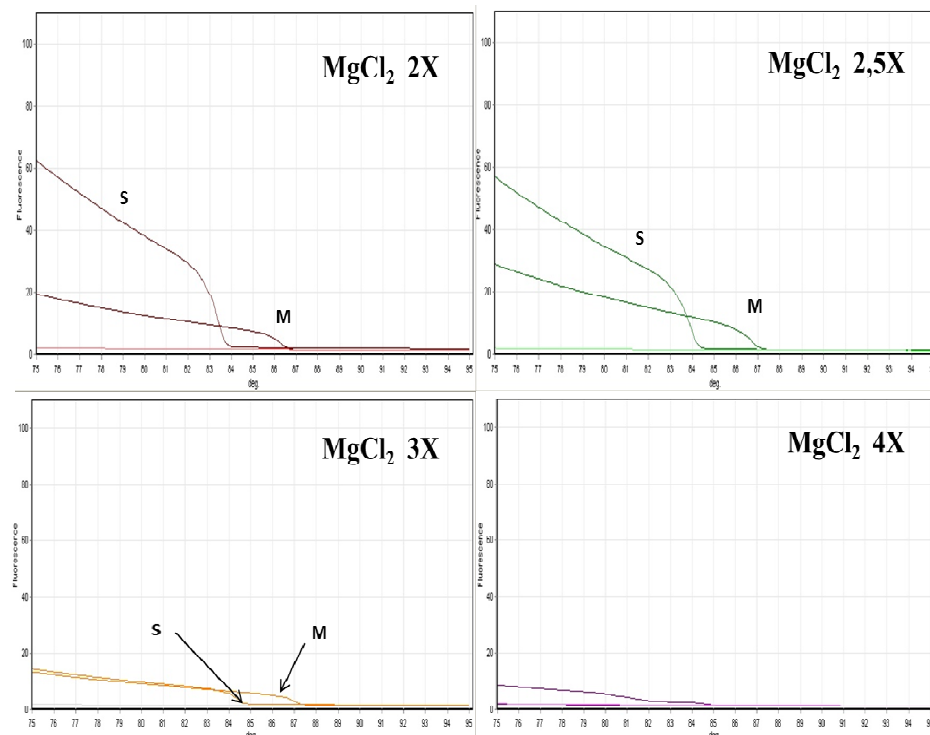


Figura 106. Cinetiche d'amplificazione dei campioni di DNA sottoponendo la coppia di primers miR34b/cmB al protocollo di PCR descritto in tab. 35.

Per aumentare l'efficienza d'amplificazione di questi campioni abbiamo provato a variare le concentrazioni di $MgCl_2$ (fig. 107). La concentrazione di Mg^{2+} , infatti non deve essere limitante; tutto ciò che metabolizza polimeri di nucleotidi necessita del magnesio: se la sua concentrazione è largamente eccedente il sistema d'amplificazione diventa inaccurato aumentando la frequenza degli appaiamenti dei primers a sequenze non omologhe in quanto le due cariche positive del magnesio possono interagire con i fosfati e dare una stabilità d'appaiamento anche tra sequenze non omologhe.



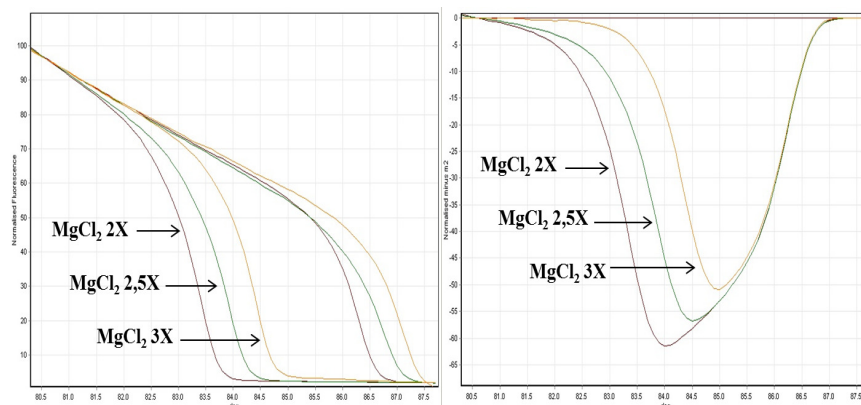


Figura 107. Amplificazione dei punti curva M e U con i primers miR34b/cMB a varie concentrazioni di MgCl₂.

La maggior efficienza d'amplificazione alla diminuzione della concentrazione di magnesio è stata confermata anche sull'amplificazione dei campioni di DNA tumorali e non (fig. 108).

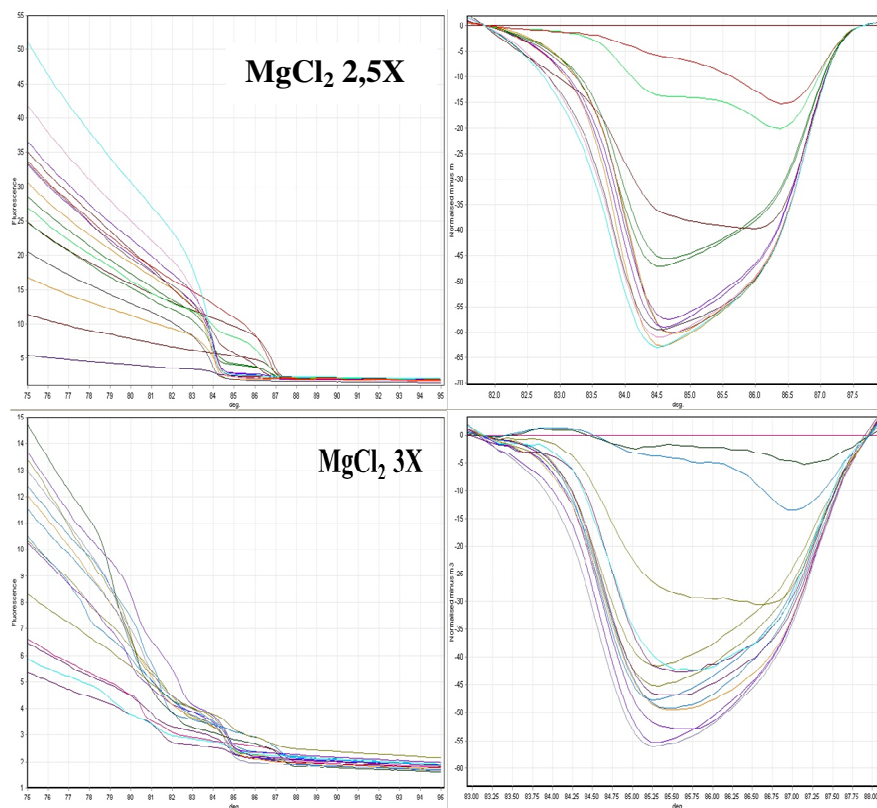


Figura 108. Amplificazione dei punti curva e dei campioni di DNA con i primers miR34b/cMB a varie concentrazioni di MgCl₂.

In base a questi risultati il protocollo di PCR utilizzato per l'amplificazione dei campioni di DNA tramite la coppia di primer miR34b/cmB è stato modificato (tab. 37).

	<i>Volume</i>	<i>Concentrazione finale</i>
<i>PCR Buffer II 10X (Applied)</i>	1,25 µl	1X
<i>MgCl₂ Solution 25mM (Applied)</i>	1,25 µl	2,5 µM
<i>dNTPs 5000 µM</i>	2 µl	800 µM
<i>Pr. Forward 10 µM</i>	0,75 µl	600 nM
<i>Pr. Revers 10 µM</i>	0,75 µl	600 nM
<i>Taq Gold (5 U/µl)</i>	0,1 µl	1U
<i>Syto9 (50 µM)</i>	0,375 µl	1,5 µM
<i>H₂O</i>	5,025 µl	
<i>DNA</i>	1 µl	

Tabella 37. Protocollo di PCR utilizzato per le reazioni d'amplificazione con la coppia di primers miR34b/cmB.

14.6 HRMA nello Studio della Metilazione

L'analisi tramite High Resolution Melt ha prodotto risultati rilevanti nella valutazione del grado di metilazione del DNA. Come detto precedentemente, questa tecnica rappresenta un'applicazione estesa del processo di denaturazione del DNA. La reazione di denaturazione permette la transizione delle molecole da una struttura nativa, vale a dire a doppia elica, a una struttura denaturata a singola elica.

Grazie all'impiego, in questa tecnica, degli intercalanti di terza generazione, il profilo di dissociazione delle molecole può essere analizzato con elevata sensibilità sfruttando lo specifico segnale di fluorescenza che deriva dal loro utilizzo.

L'HRM è in grado di discriminare sia da un punto di vista qualitativo che quantitativo, i cambiamenti dei profili di metilazione del DNA a livello delle isole/nucleotidi CpG. Il diverso contenuto in GC delle molecole altera il loro comportamento di dissociazione dovuto al diverso contenuto energetico degli ampliconi e al numero di legami a idrogeno.

La temperatura di melting (T_m), cioè la temperatura alla quale metà delle molecole di DNA presenti nel campione si trovano nello stato denaturato, dipende dal rapporto $(G+C)/(A+T)$; dove la coppia di basi GC è stabilizzata da tre legami a idrogeno, mentre la coppia AT da due, l'energia dell'impacchettamento delle basi tra una G e una C è maggiore rispetto a quella delle coppie AT (fig. 109).

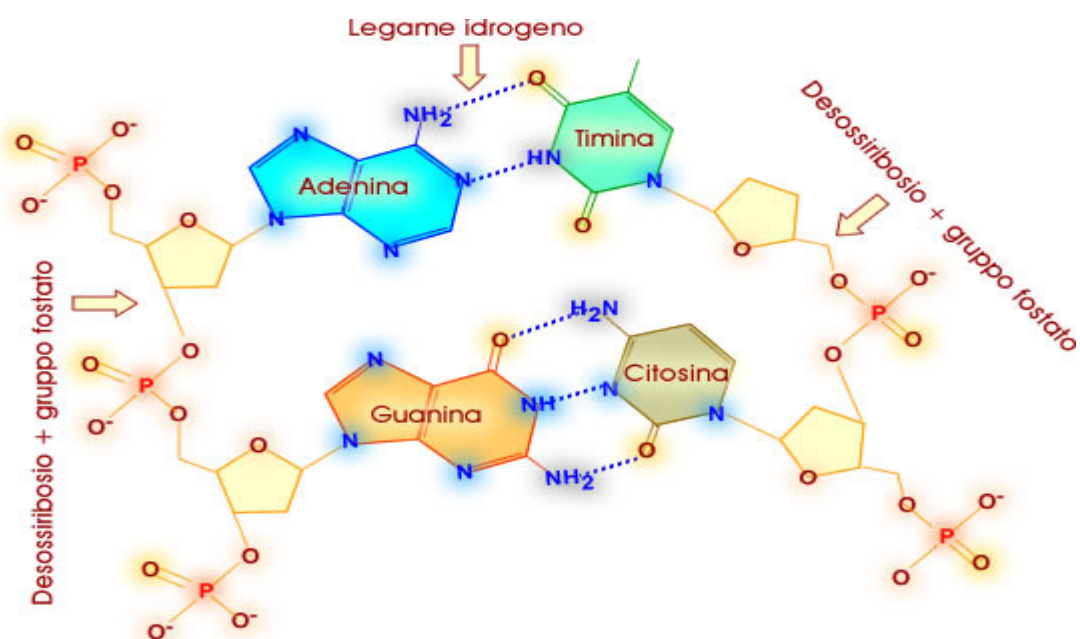


Figura 109 I legami ad idrogeno tra le basi che sono coinvolti nella stabilizzazione della doppia elica.

La variazione della T_m , tra DNA metilato e non metilato, è quindi rilevante poiché differente è il numero complessivo di legami a idrogeno da rompere per ottenere la separazione dei due filamenti. L'High Resolution Melt rileva con elevata sensibilità le temperature di denaturazione dei prodotti di PCR, permettendo di discriminare le varie specie di DNA in base ai loro diversi livelli di metilazione, i quali produrranno delle curve di dissociazione con cinetiche differenti, specifiche per ogni campione. Una maggiore metilazione a livello delle isole CpG provoca l'aumento della T_m , che viene indicata dallo spostamento (shift) delle curve verso destra; al contrario, le curve corrispondenti a campioni di DNA con livelli di metilazione inferiori, sono caratterizzate da uno shift verso sinistra, dove le temperature di dissociazione sono più basse.

Al termine della reazione di amplificazione, i campioni vengono sottoposti all'analisi tramite High Resolution Melt, attraverso l'utilizzo del Rotor-Gene 6000 (Corbett Research-Diatech). Questo strumento ha un'elevata sensibilità ed è in grado di operare variazioni di temperatura con un'alta precisione, secondo intervalli di temperatura molto ravvicinati.

I cambiamenti delle condizioni di temperatura prevedono una fase iniziale di pre-melt costituita da:

- 5 min a 95°C
- 1 min a 40°C

Nei primi 5 min si ha la completa denaturazione degli amplificati; la successiva diminuzione della temperatura comporta la loro rinaturazione nella conformazione a doppio filamento. Questo passaggio di pre-melt serve per assicurare la completa incorporazione dell'intercalante fluorescente tra le due eliche in modo da aumentare la sensibilità dell'analisi.

A ciò segue un aumento graduale della temperatura da 75°C fino a 95°C (per i primers del miR 34b/c) e da 70°C a 90°C (per i primers del miR 9-1), entrambi con incrementi progressivi di 0,1°C/s. Questi intervalli di temperatura contengono al loro interno la temperatura di melting delle molecole di DNA analizzate.

14.7 Interpretazione dei Risultati HRMA

Il software in dotazione con lo strumento ci permette di seguire in tempo reale il processo di denaturazione delle molecole di DNA.

Al termine della corsa è possibile far eseguire al software una serie di analisi matematiche che vengono visualizzate attraverso dei grafici (amplification plot), descrittivi della variazione della fluorescenza (F o dF) in funzione della variazione della temperatura (T). Da una prima analisi, sull'amplification plot, si possono visualizzare una serie di curve, corrispondenti ad ogni campione analizzato, in cui ogni punto della curva viene espresso in funzione della fluorescenza (lungo l'asse Y), e della temperatura (lungo l'asse X) (fig. 110).

Il valore di fluorescenza intercettato da ogni curva sull'asse Y è direttamente proporzionale alla concentrazione di DNA amplificato presente in ogni campione; questo parametro può essere utilizzato come criterio per risalire all'efficienza della precedente reazione di PCR.

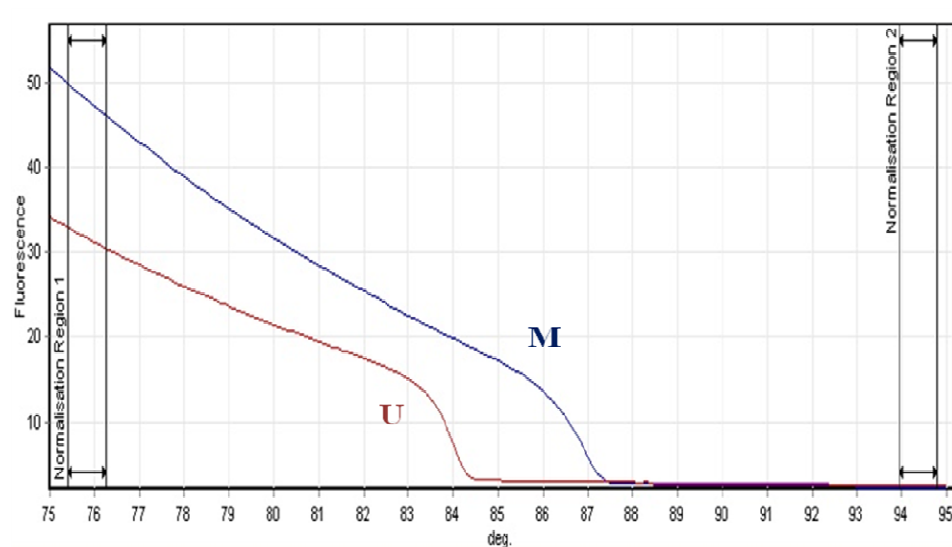


Figura 110 Amplification plot HRM in cui sono evidenziate le curve corrispondenti ai campioni di controllo FULL METHYLATED (M) e UNMETHYLATED (U) DNA.

Come descritto in precedenza, quando un amplificato di PCR viene sottoposto ad un incremento di temperatura, si ha una progressiva diminuzione della fluorescenza con un abbassamento più rapido in corrispondenza della temperatura di dissociazione in cui il 50% delle molecole dell'amplificato risultano dissociate, questo punto è rappresentato dal punto di

flesso della curva stessa. Il punto di flesso di ogni curva corrisponde alla “temperatura di melting” del campione di DNA, il cui valore coincide con l’intercetta sull’asse X.

La temperatura di melting varia in base alla sequenza nucleotidica delle molecole: la temperatura di dissociazione del DNA FULL METHYLATED (**M**) è maggiore rispetto a quella del DNA UNMETHYLATED (**U**), a causa del più elevato contenuto di citosine; ciò comporta uno shift della curva verso destra. La curva corrispondente al controllo UNMETHYLATED (**U**) è quindi “spostata” verso sinistra a causa delle modificazioni di sequenza provocate dal trattamento col bisolfito di sodio, che ha convertito tutte le citosine in timine.

È possibile con il software, procedere ad una “normalizzazione” dei dati. Con questo criterio tutte le curve presenti sull’amplification plot vengono traslate in modo che la fluorescenza di partenza (alla temperatura più bassa), risulti uguale per tutti i campioni e sia circa intorno a 100 UF (unità di fluorescenza).

È inoltre possibile restringere l’intervallo di temperatura da analizzare, in modo da focalizzare la regione in cui la diminuzione della fluorescenza risulta più evidente (fig. 111).

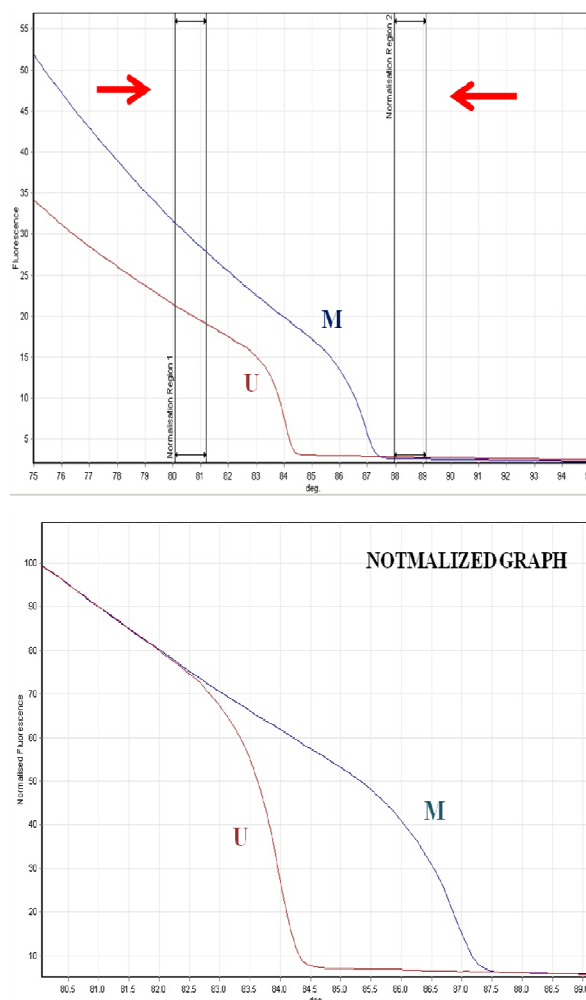


Figura 111 Elaborazione del grafico normalizzato HRM.

Nel grafico normalizzato le curve mantengono il loro caratteristico andamento sigmoidale. Il software permette di visualizzare, per ogni campione, la variazione dell'incremento di fluorescenza in funzione dell'aumento di temperatura (dF/dT) eseguendo matematicamente la derivata prima. La derivata trasforma la curva sigmoide in una curva con un punto di massimo, il quale corrisponde al flesso della curva presente sul grafico normalizzato che coincide con la temperatura di melting del campione, risultando in questo modo di più facile valutazione. Nel grafico di melt ogni picco individua, sull'asse delle ascisse, la temperatura di dissociazione (o di melting) corrispondente ai vari campioni di DNA; l'integrale sotteso al picco è proporzionale alla quantità di campione. La forma di ogni picco, se più stretto o più largo, dipende dalla purezza del prodotto d'amplificazione (grado di specificità dei primers, presenza di prodotti di PCR aspecifici); se il picco è più stretto la purezza del campione è elevata (fig. 112).

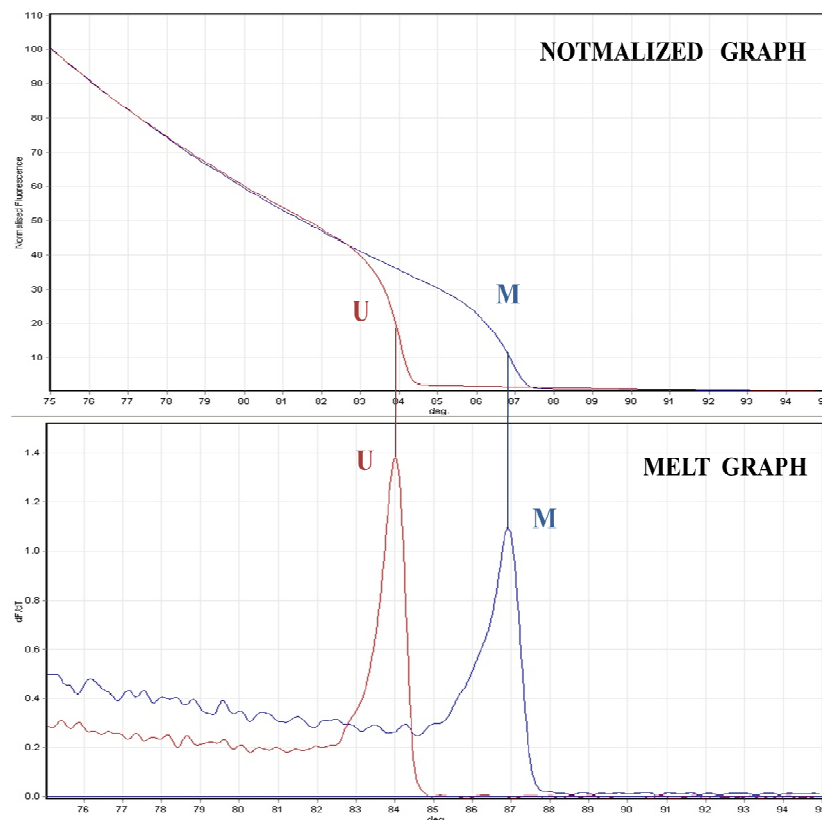


Figura 112. Elaborazione del grafico di Melt in cui ogni picco coincide col punto di flesso delle curve normalizzate.

La temperatura di melting è un dato caratteristico di ogni singolo campione ed è dipendente dalla lunghezza dell'amplicone e dal suo contenuto di C/G.

L'High Resoluton Melt Analysis consente di elaborare anche grafici differenziali oltre che normalizzati.

Ogni curva disegnata sul grafico differenziale è il risultato della sottrazione delle curve presenti nel grafico normalizzato. L'operatore può scegliere quale curva prendere come riferimento: per esempio, se si prende come riferimento la curva **M**, il software sottrae il valore della coordinata Y di ogni punto appartenente alla curva **U** al valore della coordinata Y di ogni punto della curva **M**, disegnando un picco con valori di Y negativi. Al contrario, se si prende come riferimento la curva **U**, il software sottrae il valore della coordinata Y di ogni punto appartenente alla curva **M** al valore della coordinata Y di ogni punto della curva **U**, disegnando un picco positivo (fig. 113).

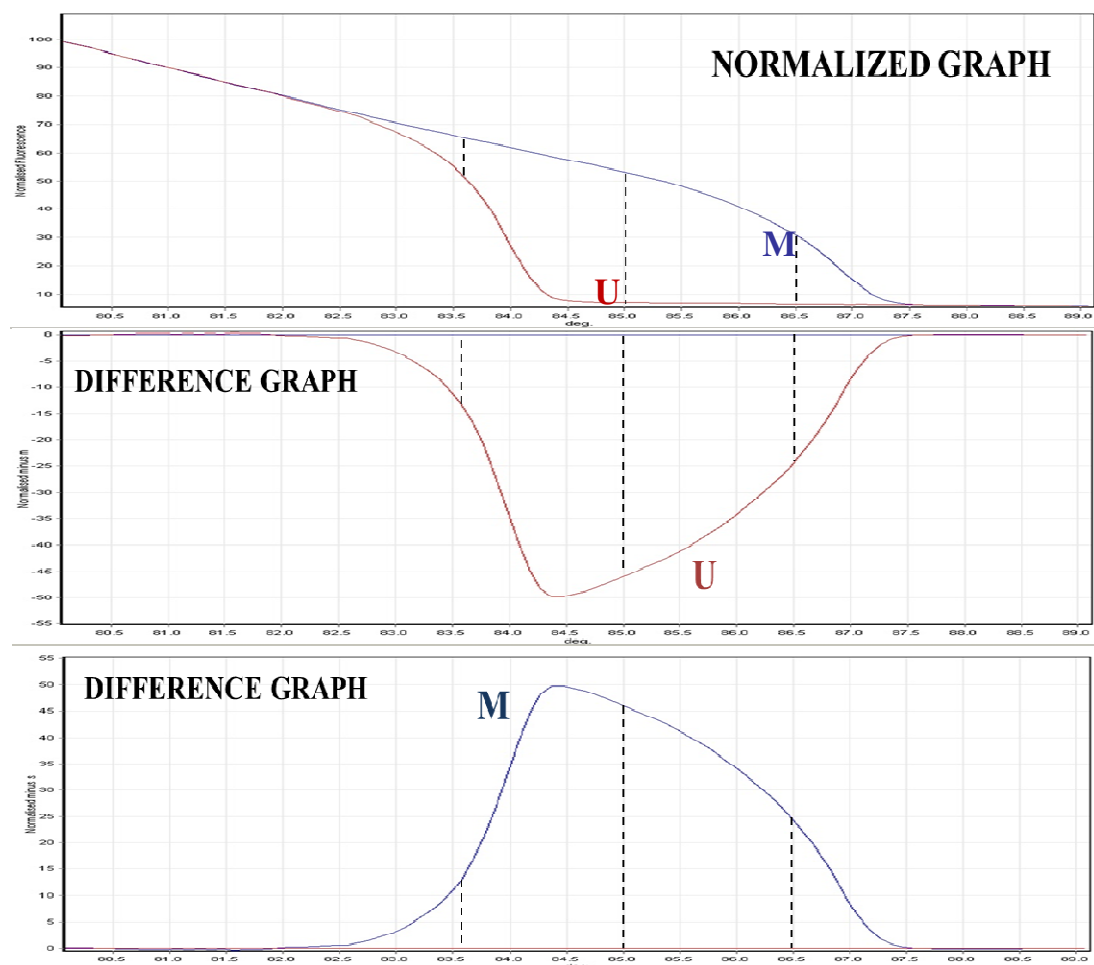


Figura 113 Elaborazione del grafico differenziale HRM.

14.8 Estrapolazione dei dati di Metilazione dell'Analisi HRM

Da ogni esperimento relativo all'analisi dello stato di metilazione dei campioni di DNA derivanti sia dai tessuti tumorali che dalle corrispettive mucose sane, sono stati estrapolati i dati relativi alla variazione di fluorescenza (dF) nella curva di dissociazione degli ampliconi relativi agli stessi campioni (fig. 114).

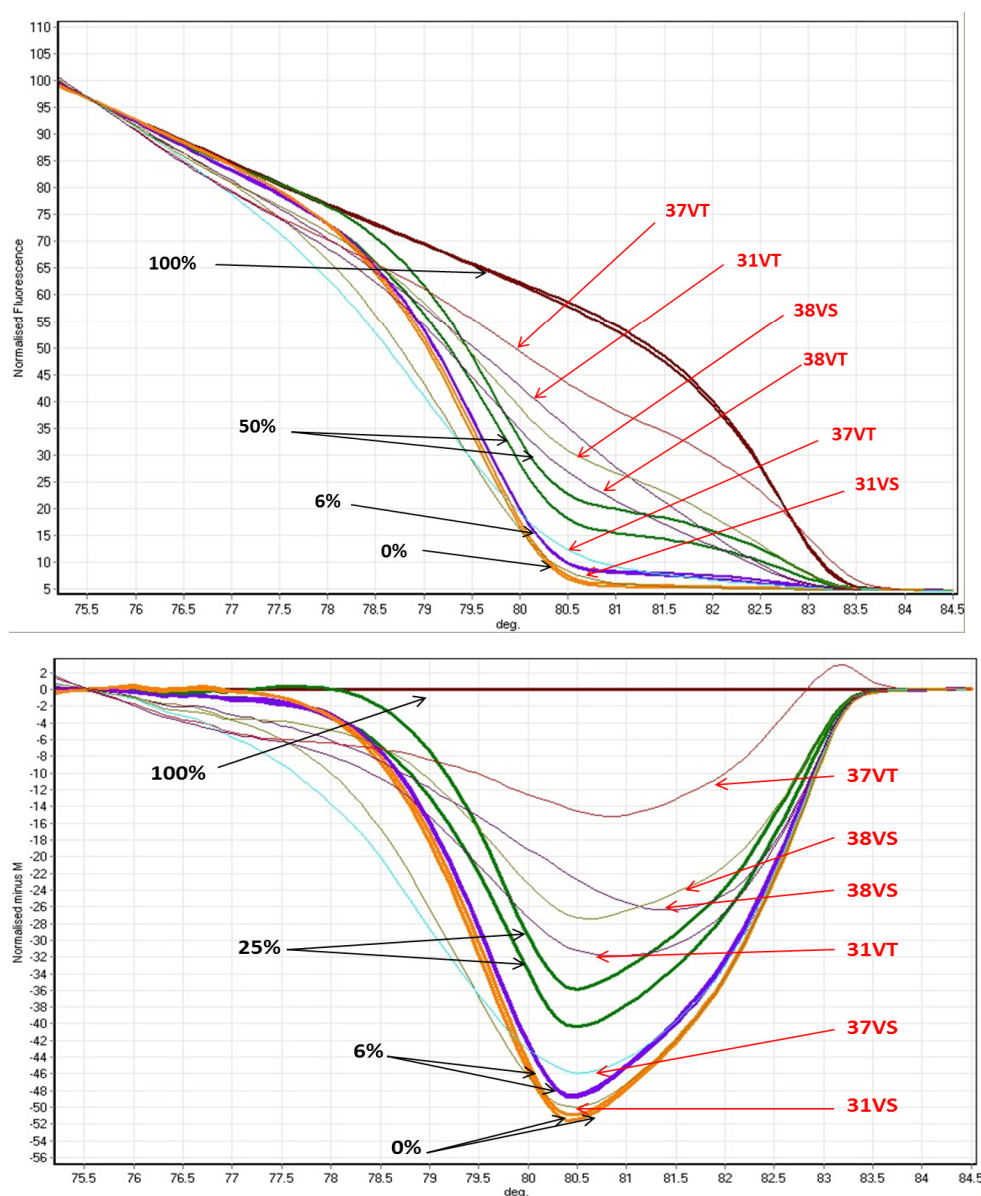


Figura 114 Esempio di grafico normalizzato e differenziale estrapolato dall'analisi HRM di quattro punti curva e alcune coppie di DNA tumorale e non.

Per ogni campione presente sul grafico differenziale, ricaviamo il valore della variazione di fluorescenza, in corrispondenza del picco di ogni curva, che viene espressa in funzione della temperatura di melting specifica per ogni campione.

I valori relativi alla dF dei punti appartenenti alla curva di diluizione vengono immessi in un grafico in funzione della percentuale di metilazione specifica per ogni campione (fig. 115)

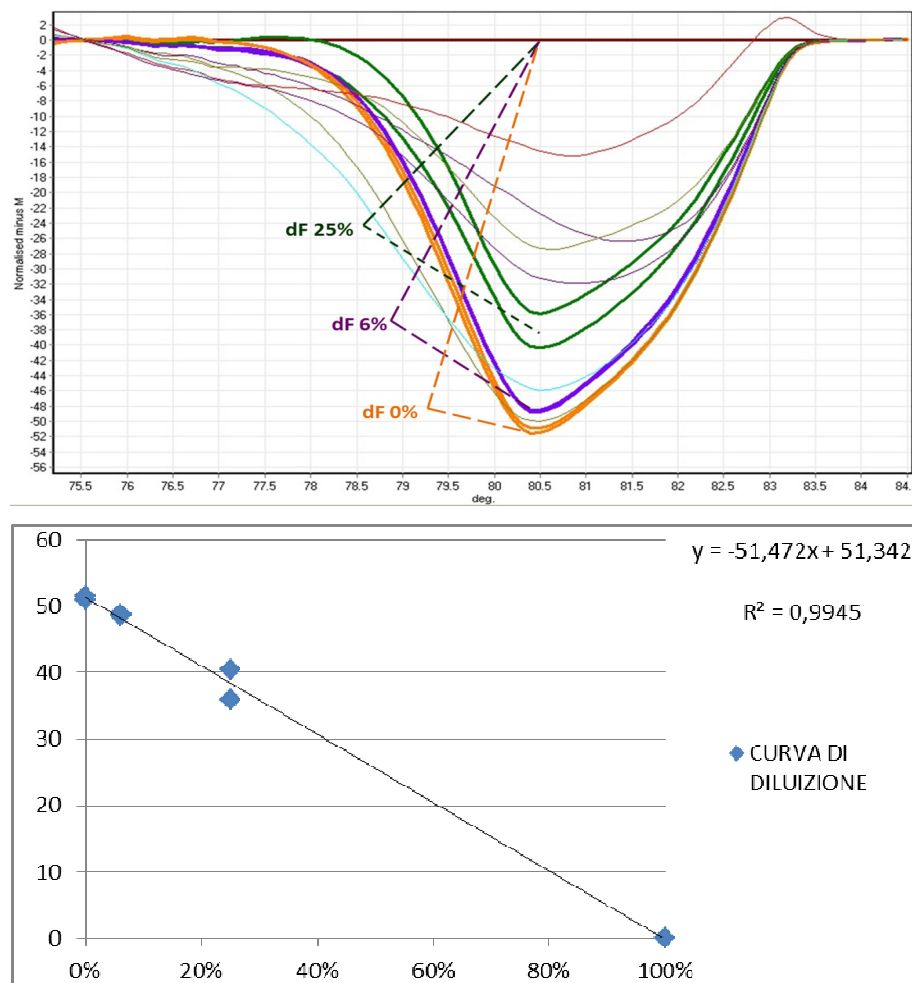


Figura 115 Elaborazione dei valori di dF della curva di taratura in funzione della loro percentuale di metilazione.

Tramite l'espressione della retta passante per i punti presenti sul grafico (es.: $y = -51,472x + 51,342$) ricaviamo la percentuale di metilazione di ogni campione di DNA (x) sostituendo nell'equazione il valore della sua dF (y)

14.9 Analisi dell' Espressione dei MiR-9-1 e -34b e -34c

I tessuti dei soggetti sottoposti all'analisi della metilazione, sono stati successivamente utilizzati per l'estrazione dei miRNA e la valutazione dell'espressione dei geni miR 9-1, miR-34b e miR-34c.

I miRNA estratti sono stati sottoposti ad una reazione di trascrizione inversa (RT-PCR), per ottenere i corrispondenti cDNA.

Sono stati utilizzati primer specifici per i geni:

- 1) miR-9-1 (ID 000583)
- 2) miR-34b (ID 002102)
- 3) miR-34c (ID 000428)

(TaqMan MiRNA Assay, Applied Biosystems) e i reagenti del Taqman[®] MiRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems).

L'RT è stata eseguita a partire da 10ng di miRNA in un volume finale di 15µl, secondo il seguente protocollo:

RT Buffer	1X
dNTPs Mix	100µM
RNase Inhibitor	3,8 U/µl
MgCl2 Solution	5,5mM
RT Primer	1X
Multi Scribe reverse Transcriptase	50U

Tabella 38 Protocollo per RT

I campioni, prima di essere inseriti nel termociclatore, sono stati tenuti in ghiaccio per 5 minuti, come previsto dal protocollo. Le condizioni di temperatura prevedono:

- 30 minuti a 16°C
- 30 minuti a 42°C
- 5 minuti a 85°C

Per la Real-Time PCR è stato utilizzato lo strumento ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems).

La valutazione dell'espressione dei miRNA è stata ottenuta mediante una quantificazione relativa, rapportando la quantità del gene analizzato presente in ogni campione rispetto ad un gene di riferimento (housekeeping).

Nel nostro caso abbiamo utilizzato come gene di riferimento il miR-RB6U verso il quale abbiamo normalizzato i dati relativi a ciascun miRNA tramite l'applicazione della formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

15. RISULTATI

15.1 Metilazione dei miRNA nei Tessuti CRC e nella Mucosa Sana

I risultati relativi alla metilazione dei microRNA sono stati riportati in dei grafici dove, per ogni miRNA analizzato, viene mostrata la metilazione relativa ai tessuti tumorali e ai corrispettivi tessuti sani.

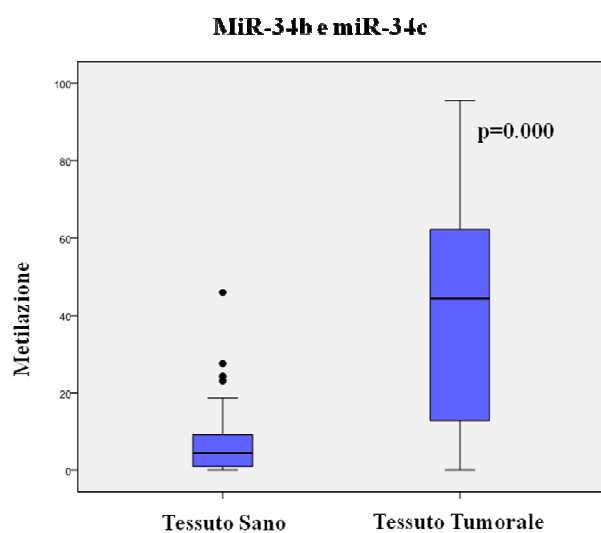


Figura 116

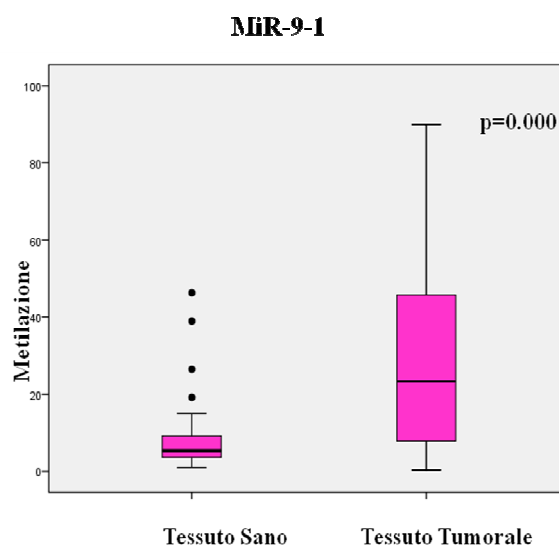


Figura 117

L'Analisi della Metilazione sulle 80 coppie di tessuti di pazienti affetti da CRC ha mostrato sia per il miR-34b/c che per il miR-9-1 una significativa ipermetilazione nel tessuto tumorale rispetto a quello sano (Fig. 116 e 117)

15.2 Espressione dei miRNA nei Tessuti CRC e nella Mucosa Sana

Il procedimento utilizzato per l'elaborazione dei risultati della metilazione, è stato applicato anche ai dati ottenuti con l'analisi dell'espressione dei microRNA.

Di seguito sono riportati i grafici relativi all'espressione di ogni miRNA analizzato, sia per quanto riguarda i tessuti tumorali che le corrispettive mucosa sane.

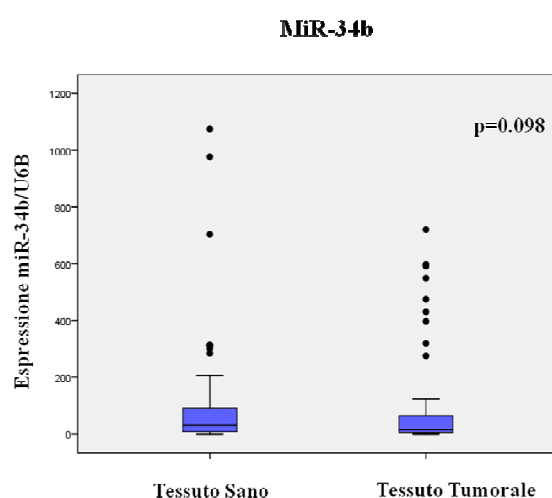


Figura 118

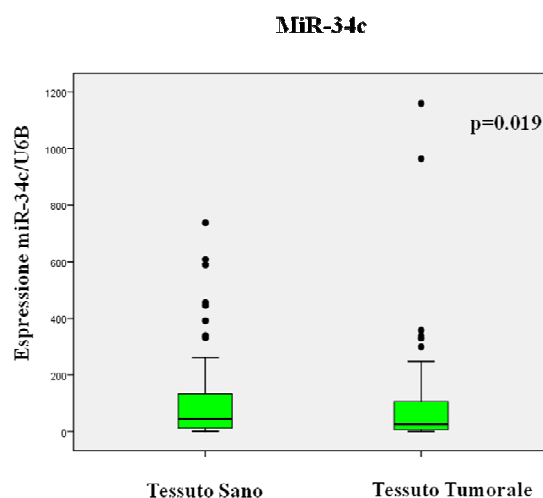
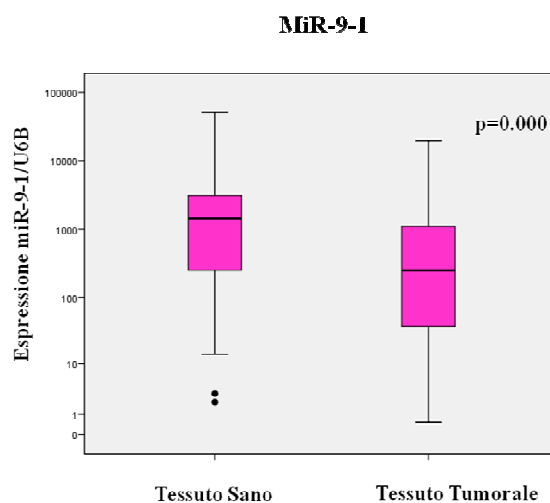


Figura 119



Confrontando l'espressione tra le coppie di tessuto nei 3 miRNA, miR-34b, miR-34c e miR-9-a, si può notare che in tutti i casi si ha un'overespressione nei tessuti sani, ma solo per il miR-34c e il miR-9-1 si raggiunge la significatività. La downregolazione della loro espressione e l'ipermetilazione di questi miRNA nel tessuto tumorale, dimostra la presenza di un meccanismo epigenetico alla base della loro regolazione.

15.3 Correlazione tra Metilazione e Espressione dei MiRNA

I risultati della metilazione e dell'espressione dei microRNA sono stati messi a confronto tra di loro utilizzando vari tipi di analisi. Per ogni miRNA è stata inizialmente messa in correlazione l'espressione con la metilazione di tutti i campioni, sia sani che tumorali. In seguito è stata confrontata l'espressione e la metilazione dei soli campioni di DNA tumorale e infine l'espressione e la metilazione dei soli tessuti sani.

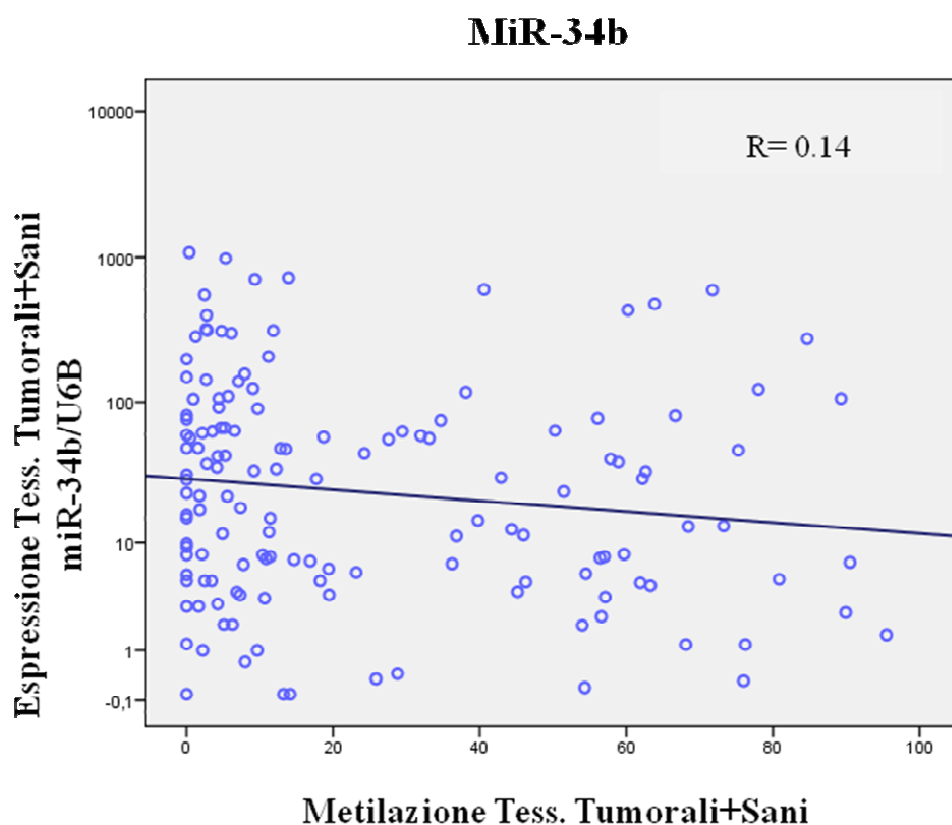


Figura 121

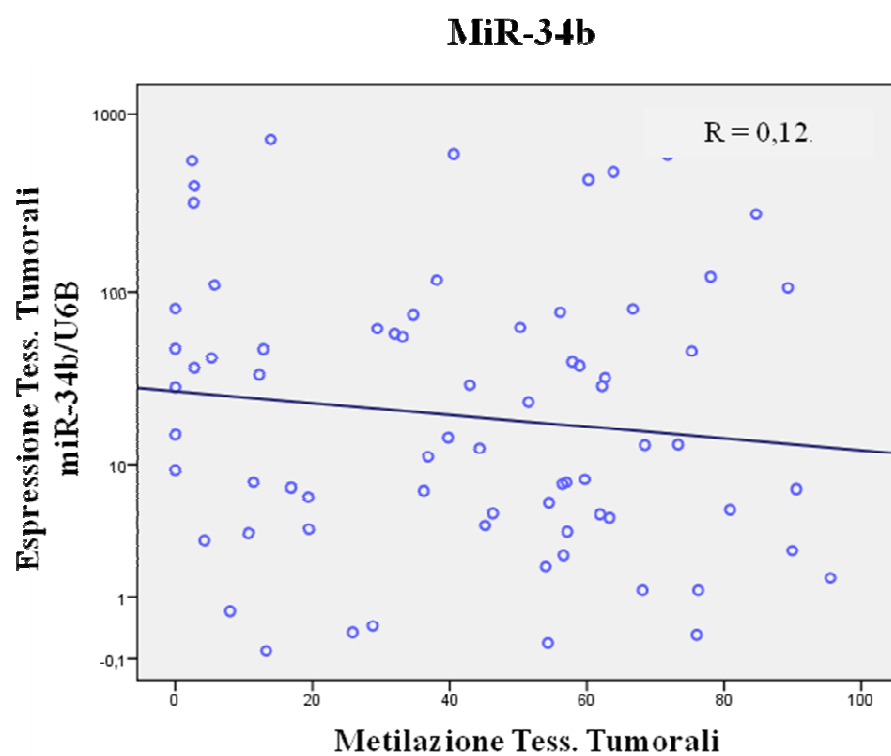


Figura 122

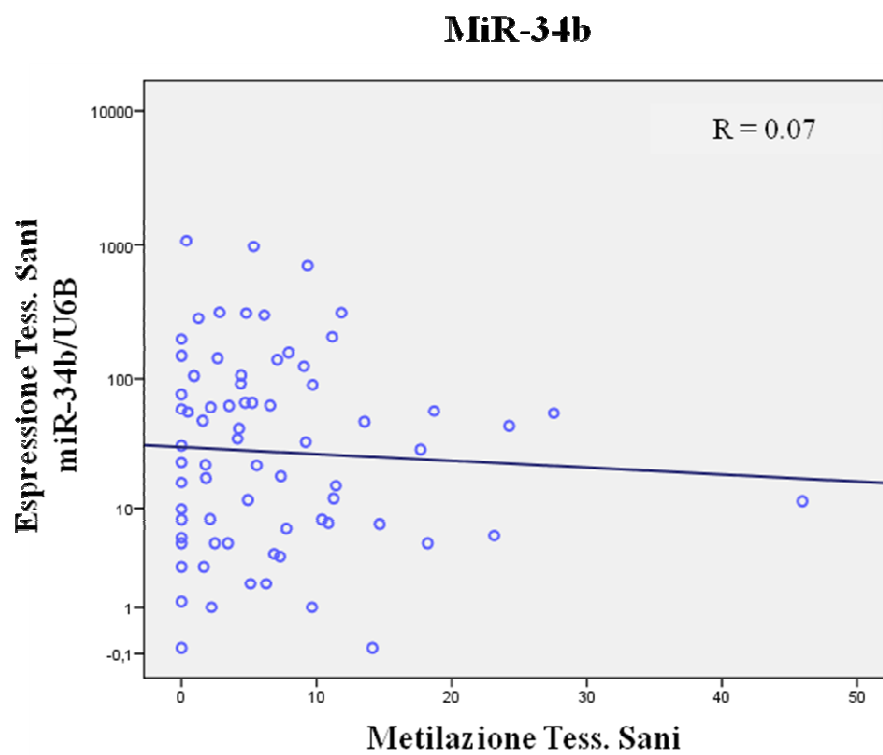


Figura 123

MiR-34c

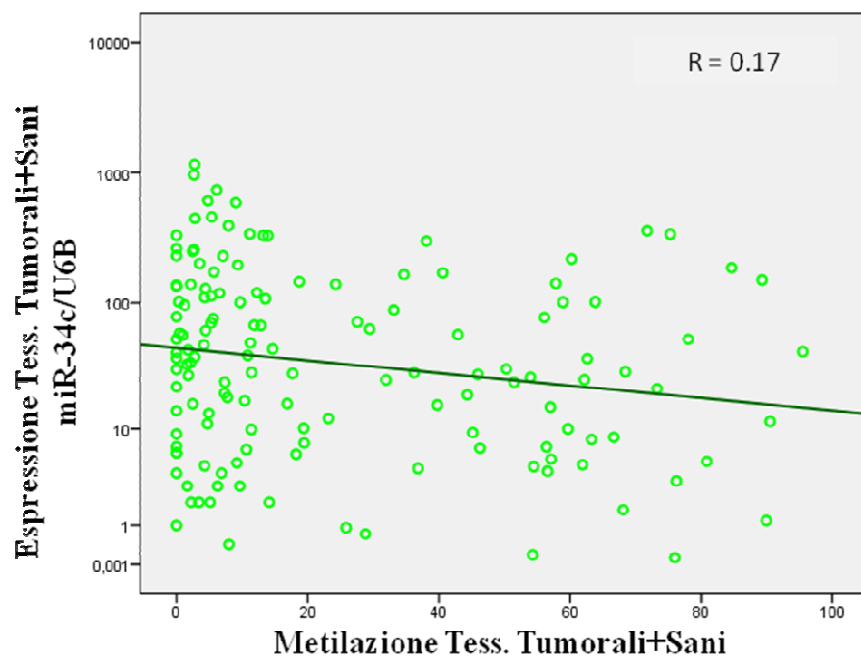


Figura 124

MiR-34c

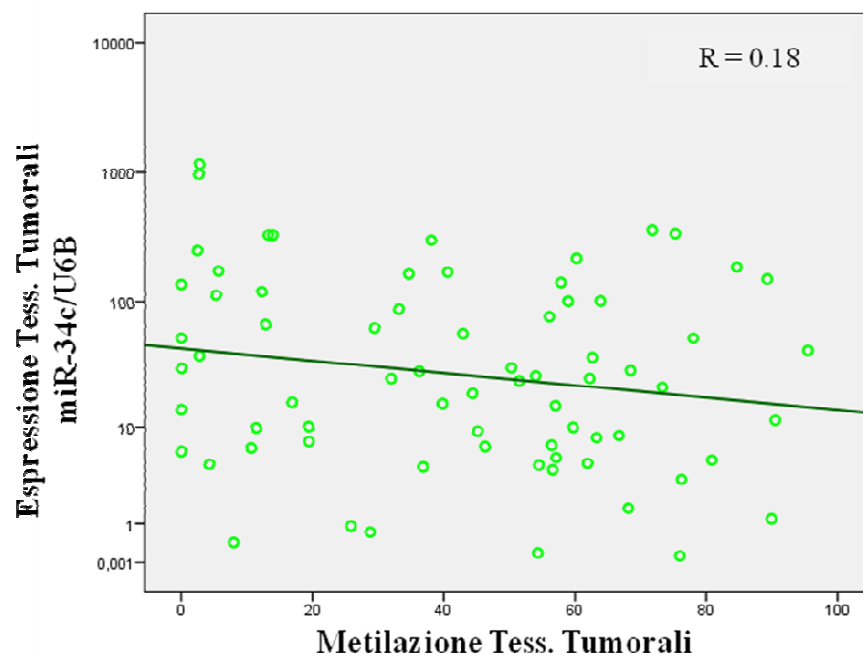


Figura 125

MiR-34c

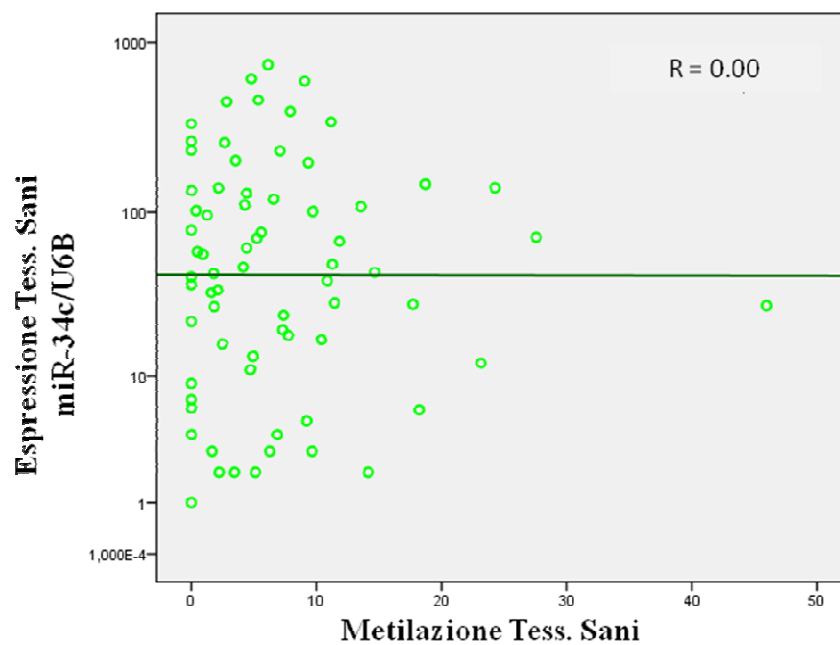


Figura 126

MiR-9-1

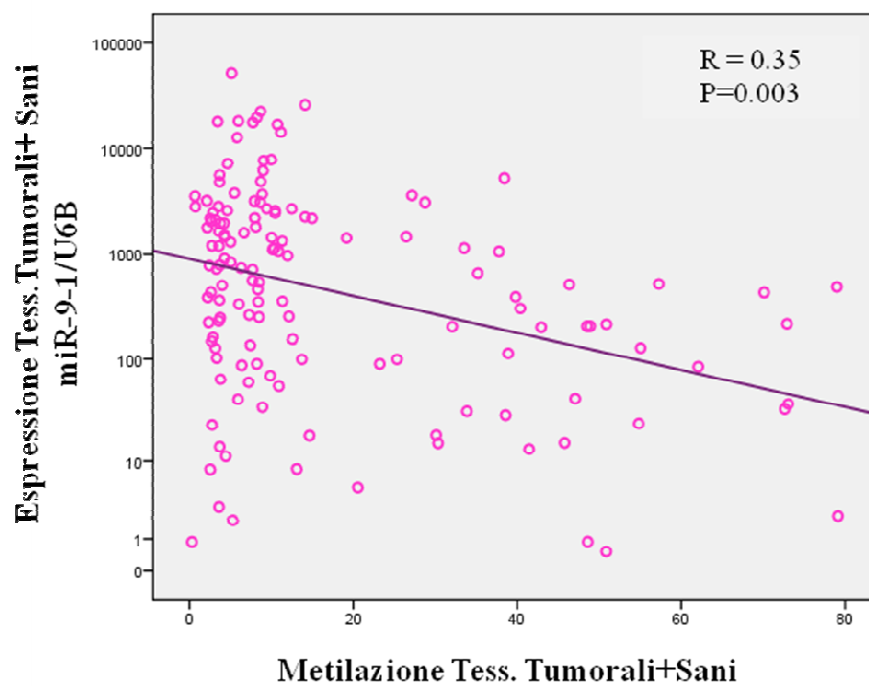


Figura 127

MiR-9-1

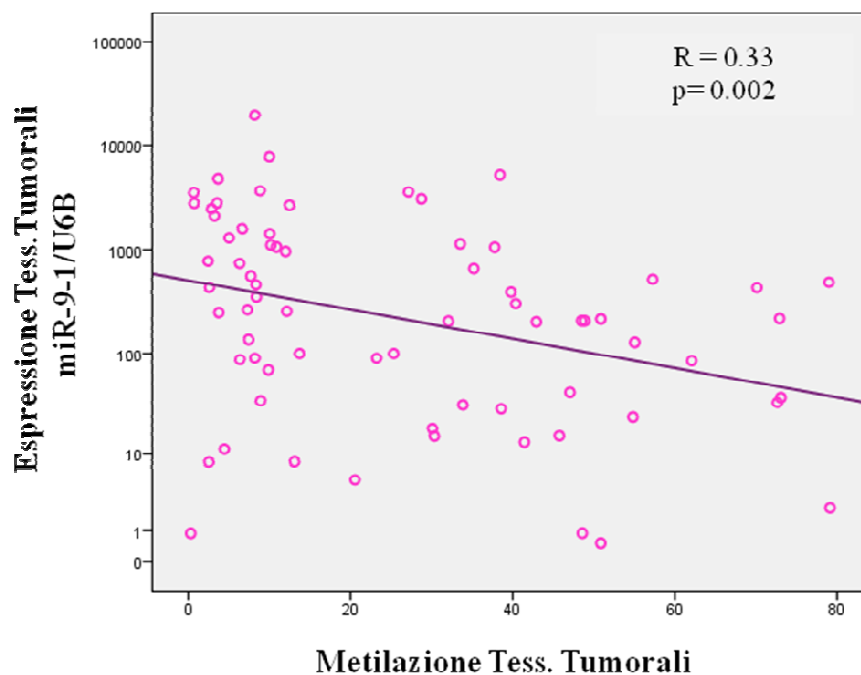


Figura 128

MiR-9-1

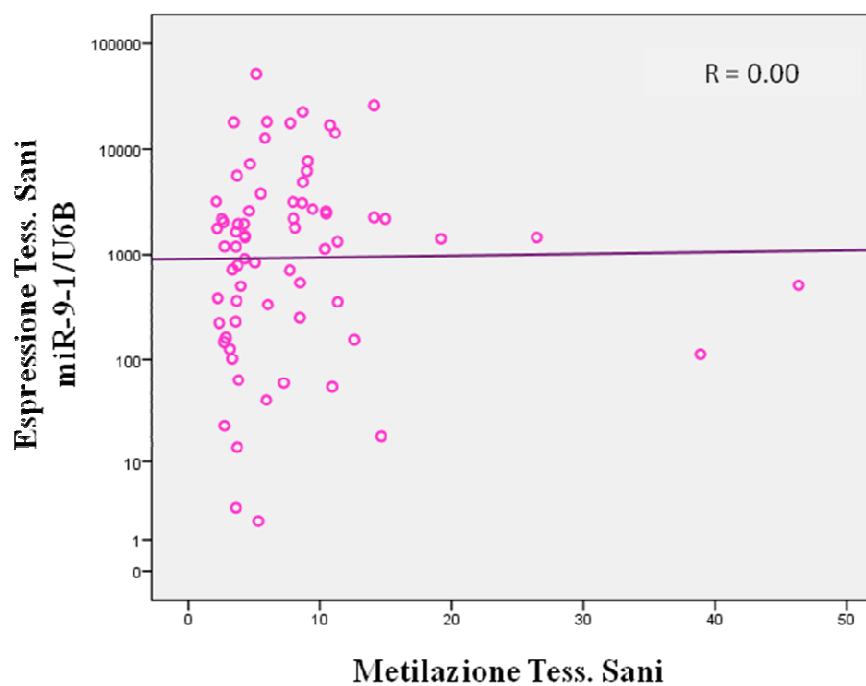


Figura 129

Come mostrato dalle figure precedenti (fig 121-129), la distribuzione dei campioni per i 3 miRNA nei tessuti tumorali risulta avere un andamento a dispersione, mentre nei tessuti sani la distribuzione risulta essere omogeneamente raggruppati verso livelli di metilazione bassi. L'unico miRNA che presenta una significatività nella correlazione tra i livelli di metilazione e espressione è il miR-9-1, in particolare tra tutti i campioni sia sani che tumorali ($p=0.003$), ma anche nel grafico in cui si è considerato i tessuti tumorali da soli ($p=0.002$).

16. CONCLUSIONI

Come noto il cancro è il prodotto ultimo di un ampio spettro di possibili alterazioni geniche, capaci di influenzare l'espressione di geni in grado di svolgere funzioni promotrici lo sviluppo di neoplasie maligne (oncogeni) o di sopprimere l'attività dei controllori negativi del nostro genoma (oncosoppressori).

Questo tipo di visione dualistica della regolazione genica ha tenuto campo per numerosi anni come unico meccanismo perturbato nella cellula tumorale.

Solo recentemente si sono fatti strada altri possibili scenari di modulazione genica, che prescindono dal classico modello mutazionale, ormai diffusamente comprovato, a carico di queste due categorie di geni. Lo studio dei fenomeni epigenetici, quelli cioè che si possono verificare nel corredo trascrizionale e traduzionale delle cellule tumorali, ha aperto un ampio scenario speculativo, di ricerca ma anche di potenziali risvolti clinico-terapeutici.

La metilazione delle sequenze regolatrici di geni potenzialmente coinvolti nei meccanismi carcinogenetici è stato il primo esempio di fattori non genetici che modificano l'espressione genica. Si tratta in questo caso di un fenomeno interferente che si esplica interamente sull'aspetto trascrizionale della funzione genica.

Diverso è il caso dei miRNA che esercitano la loro azione modulante a livello post-trascrizionale.

In pratica l'effetto della metilazione del DNA è in qualche modo evidenziabile, anche se in maniera indiretta, attraverso la misura dell'espressione stessa di uno specifico mRNA, cosa che ovviamente è meno proponibile quando si voglia identificare in maniera quantitativa l'efficacia di un miRNA nel modulare la traduzione di un prodotto genico. Il primo motivo di ciò è legato al fatto che il miRNA agisce a prescindere dai livelli del trascritto primario: quindi si può correttamente misurare la quantità di un prodotto di trascrizione, ma non sapremo mai quale sarà la quota di questo mRNA che 'sfuggerà' al controllo da parte del miRNA.

L'altro e forse più importante aspetto, è legato al fatto che, per le loro esigue dimensioni, i miRNA possono essere interpretati come regolatori multipli di un ampio spettro di mRNA, con un'efficacia di azione che probabilmente differisce da gene a gene. A complicare le cose emerge poi l'evidenza che un singolo mRNA possa avere sequenze di riconoscimento per molteplici miRNA.

Si disegna così una complessa rete di interazioni tra miRNA e mRNA che difficilmente potrà significare qualcosa di importante, almeno fino a quando non sarà disegnata una mappa accurata di quei miRNA che rivestono un valore biologico e clinico per ogni specifico tipo di neoplasia.

Anche se non rispondenti ai classici canoni dei geni trascritti, anche i miRNA sono prodotti da specifici geni, per poi subire numerose tappe maturative. Quali che siano i meccanismi coinvolti nell'interazione miRNA-mRNA, uno dei parametri essenziali nella comprensione dei meccanismi funzionali di un miRNA è comprendere se il suo prodotto di espressione risulti aumentato o ridotto nel tessuto tumorale e se la sua azione mimi il comportamento di un oncogene o di un gene oncosoppressore.

Quindi anche i geni MIR sottostanno ad un meccanismo superiore di controllo genico che influenza positivamente o negativamente la loro espressione.

Tuttavia, anche nel caso di questa categoria di geni particolari, era prevedibile la coesistenza di meccanismi di controllo epigenetico dell'espressione.

Infatti, almeno in alcuni geni MIR sono state descritte regioni a monte del sito di trascrizione che includevano vere e proprie isole CpG, quindi potenzialmente metilabili.

La nostra attenzione si è focalizzata su due geni MIR (miR-34b/c e miR-9-1) la cui espressione è regolata, secondo alcuni autori, attraverso vari gradi di metilazione. Il modello nel quale abbiamo voluto verificare la presenza di questo fenomeno è stato quello del cancro del colon-retto.

Le strategie di uno studio osservazionale di questo tipo sono, secondo il nostro punto di vista, di tre tipi. Per primo abbiamo voluto verificare se la densità di metilazione dei geni suddetti mostrasse differenze significative tra DNA tumorale e quello derivato dalla mucosa sana dello stesso soggetto. Solo in questo modo si ha una dimostrazione 'ex vivo' della reale presenza del fenomeno.

L'altra direttrice dello studio è stata quella di verificare la differenza di espressione dei diversi miRNA nei due gruppi di tessuti, sani ed affetti. Era infatti lecito attendersi che a fronte di un diverso livello di metilazione, facesse fronte una variazione dell'espressione dei miRNA stessi.

L'obiezione a questo tipo di risultati è sicuramente riassumibile nella conoscenza del fatto che ad influenzare l'espressione di un gene qualunque e quindi anche un MIR, possano concorrere molteplici fattori genetici e laddove presenti, anche epigenetici. Resta comunque evidente il fatto che se un gene mostra nella sua regione regolatrice un'isola CpG, è lecito pensare che questo tipo di controllore genico abbia un peso preponderante nella regolazione della sua trascrizione.

In ultima analisi possiamo indicare come nel nostro lavoro abbiamo voluto verificare in campioni reali, e non solo in modelli in vitro, come l'aumento della proporzione di DNA metilato all'interno del tumore del colon-retto sia accompagnata ad una significativa riduzione dell'espressione del miRNA stesso.

Va infine ricordato che lo studio dell'espressione dei miRNA è oggi ben supportato dalla disponibilità di reagenti dedicati per il loro utilizzo in real time PCR.

Ben più complesso e meno standardizzato, è il metodo per la valutazione quantitativa del grado di metilazione delle sequenze target di DNA. Nel nostro laboratorio abbiamo da anni sviluppato tecniche rapide e sensibili, per l'individuazione di CpG metilate in DNA trattato con bisolfito di sodio.

Anche in questo studio la necessità di analizzare più sequenze per la presenza di metilazione, ma anche per stimarne l'abbondanza percentuale, abbiamo ritenuto opportuno utilizzare un'evoluzione della HRM, debitamente adattata a scopi quantitativi.

Come ampiamente dimostrato nella parte più sperimentale di questa tesi, tutte le verifiche sperimentali hanno chiaramente dimostrato che la nostra tecnica si adatta bene a questo tipo di studi in reperti biotipici umani.

In conclusione il nostro studio sembra aver dimostrato che anche nel carcinoma del colon-retto i geni miRNA miR-34b/c e miR-9-1 sono regolati con meccanismi epigenetici, legati alla diversa metilazione delle loro sequenze regolatrici.

17. CONCLUSIONI DEI TRE STUDI

Nel primo studio dove è stata valutata la distribuzione del genotipo e l'espressione del miR-196a2 (rs11614913 C-T) così come quella del miR-146a (rs2910164 C-G) miR-149 (rs2292832 C-T) e miR-499 (rs3746444 G-A) su 98 pazienti affetti da NSCLC e su 129 soggetti sani di controllo, si è dimostrata un'associazione tra l'incremento dell'espressione e tumori di alto grado solo per il miR-499. I nostri risultati sembrano dimostrare che, nei nostri pazienti, il genotipo CG del mir-146a è connesso ad un incremento del rischio per NSCLC, presumibilmente attraverso l'associazione con l'incremento dell'espressione dei miRNA; mentre il genotipo CC del miR-149 sembra rappresentare un fattore predittivo di una migliore prognosi, associato ad un'espressione incrementata del miRNA in questo gruppo di pazienti affetti da NSCLC. Infine, abbiamo confermato che il miR-196a2 è upregolato nei pazienti NSCLC ma, almeno nei nostri pazienti, in maniera indipendente dal genotipo.

Nel secondo studio eseguito su 160 pazienti affetti da CRC e 178 soggetti sani controllo, abbiamo valutato il possibile ruolo delle 4 varianti di sequenza viste precedentemente per il miR-146a, miR-149, miR-196a2 e miR-499 e se queste varianti potessero influenzare l'espressione del miRNA maturo in questo tipo di tumore. I nostri risultati mostrano una differenza statisticamente significativa nella distribuzione dei genotipi fra i tessuti provenienti da pazienti affetti da CRC e i soggetti di controllo nel miR-499, con una maggiore incidenza dell'allele G nei pazienti. In questi pazienti la distribuzione dei genotipi per questo miRNA non segue la Legge di Hardy-Weinberg, mentre risulta in equilibrio la distribuzione del genotipo dei soggetti di controllo, rafforzando l'ipotesi che il genotipo GG sia associato ad un rischio maggiore di sviluppare questa neoplasia. Nel CRC il miR-499 è l'unico che mostra una differenza statisticamente significativa tra i suoi livelli di espressione nel tessuto tumorale in confronto a quelli sani appaiati. In particolare nel tessuto tumorale, l'espressione appare significativamente ridotta. Questo dato tende a dare a questo miRNA una funzione regolatrice negativa nei tessuti sani, che viene parzialmente persa nel caso di trasformazione neoplastica della cellula stessa. Ancora una volta, nel caso del miR-499 siamo riusciti a dimostrare una variazione significativamente associata al genotipo GG da solo o in combinazione GG/AG che tende ad influenzare l'espressione del miRNA stesso.

Nel terzo studio siamo andati a valutare su 80 coppie di tessuti di pazienti affetti da CRC i livelli di metilazione dei promotori dei geni del miR-34b/c e miR-9-1 e se la loro espressione è regolata da meccanismi epigenetici. Dai nostri risultati sull'analisi di metilazione si evince che

entrambi i geni miR hanno una significativa ipermetilazione nel tessuto tumorale rispetto a quello sano. Confrontando l'espressione tra le coppie di tessuto nei 3 miRNA, miR-34-b, miR-34c e miR-9-1, si può notare che in tutti i casi si ha una downregolazione nei tessuti tumorali, ma solo per il miR-34c e per il miR-9-1 si raggiunge la significatività. Questa correlazione tra la downregolazione dell'espressione e l'ipermetilazione di questi miRNA nel tessuto tumorale dimostra la presenza di un meccanismo epigenetico alla base della loro regolazione. L'unico miRNA che presenta una significatività nella correlazione tra i livelli di metilazione e espressione è il miR-9-1, in particolare tra tutti i campioni sia sani che tumorali, ma anche nel grafico in cui si è considerato i tessuti tumorali da soli.

I risultati dei nostri studi sembrano confermare l'esistenza di fattori genetici ed epigenetici capaci di influenzare l'effetto modulatore almeno di alcuni microRNA. La presenza di varianti di sequenza a carico dei geni codificanti i microRNA (ma anche a carico delle loro sequenze target) modifica di fatto lo scenario iniziale, che vedeva nella sola valutazione dell'espressione dei microRNA il bersaglio dell'impiego diagnostico-prognostico di questa classe di RNA non codificanti.

La presenza poi di meccanismi epigenetici, dimostratisi effettivi in alcuni casi anche in modelli in vivo, aprono la strada all'impiego di terapie antitumorali in cui l'effetto demetilatore di alcuni farmaci potrebbe essere sfruttato per modulare non solo l'espressione di gruppi di mRNA, ma anche di microRNA.

18. BIBLIOGRAFIA

1. [Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C.elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementary to *lin-14*. *Cell*. 1993; 75 (5): 843-54].
2. [Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005; 6(5): 376-85].
3. [Garofalo M and Croce CM. microRNAs: Master Regulators as Potential Therapeutics in Cancer. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2011. 2010; 51:25-43].
4. [Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009; 136(4):642-55].
5. [Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flange by adenosines, indicated that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005; 120(1):15-20]
6. [Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRbase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.* 2008 Jan;36(Database issue):D154-8].
7. [Heneghan MH, Miller Nand Kerin MJ. miRNA as biomarkers and therapeutic targets in cancer. *Current Opinion in Pharmacology* 2010; 10:1-8].
8. [Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6(11):857-66].
9. [Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs- microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6(4):259-69].
10. [Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and trascription units. *Genome Res*. 2004; 14(10A):1902-10].
11. [Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004; 23(20):4051-60]
12. [Brandi N and Akiko Hata. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *J Biochm*; 2010; 148(4)381-392].
13. [Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III trascribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2006; 13(12):1097-101].
14. [Chunsheng Li, Yi Feng, George Coukos, and Lin Zhang. Therapeutic MicroRNA Startegiees in Human Cancer. *AAPS Journal*. 2009; 11].
15. [Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III trascribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2006; 13(12):1097-101]
16. [Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Dhosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003; 425(6956):415-9].

-
17. [Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, et al. The microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*. 2004; 432(7014):235-40].
18. [Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*. 2004; 18(24): 3016-27].
19. [Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*. 2004; 10(2):185-91].
20. [Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhoof E, Filipowicz W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell*. 2004; 118 (1): 57-68]
21. [Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, et. Al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*. 2005; 436(7051):740-44]
22. [Lee Y, Hur I, Park SY, Kim YK, Suh MR, Kim VN. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J*. 2006; 25(3):522-32].
23. [Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004; 116(2):281-97].
24. [Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009; 10(2):126-39]
25. [Filipowicz W. RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine. *Cell*. 2005; 122(1):17-20]
26. [Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*. 2004; 305(5689):1437-41]
27. [Leuschner PJ, Ameres SL, Kueng S, martinez J. Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep*. 2006; 7(3):314-20].
28. [Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Luhrmann R, Tuschl T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*. 2002; 110(5):563-74].
29. [Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol*. 2007; 17(3):118-26]
30. [Meister G. miRNAs get an early start on translational silencing. *Cell* 2007; 131(1):25-28].
31. [Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J, Sharp PA. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol. Cell* 2006; 21(4):533-42].
32. [Nottrott S, Simard MJ, Richter JD. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat. Struct. Mol. Biol*. 2006; 13(12):1108-14]
33. [Vasudevan S, Steitz JA. AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and argonaute2. *Cell*. 2007; 128(6):1105-18]

-
34. [Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Cell cycle control of microRNA-mediated translation regulation. *Cell Cycle*. 2008; 7(11):1545-49]
35. [Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can upregulate translation. *Science*. 2007; 318(5858):1931-34]
36. [Heneghan HM, Miller N, Newell J, Lowery AJ, Sweeney KJ, Kerin MJ. Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. *Ann Surg* 2010; 251: 499-505]
37. [Grimson A, Farh KK, Johnson WK, Garrett-Engele P. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*. 2007;91-105]
38. [Brennecke J., Stark A., Russell R.B., Cohen S.M.. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 3 (2005) e85.]
39. [Jackson RJ, Standart N. How do microRNAs regulate gene expression? *Sci STKE*. 2007; 2007:RE1].
40. [Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009; 136(4):642-55]
41. [Stark A, et al. Discovery of functional elements in 12 *Drosophila* genomes using evolutionary signature. *Nature*. 2007; 450:219-232]
42. [Orom UA, Nielsen FN, Lund AH. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translocation. *Mol Cell*. 2008; 4:460-471]
43. [Eiring A, et al. miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell*. 2010;140:652-665]
44. [Beitzinger M, Meister G. MicroRNAs: from decay to decoy. *Cell*. 2010;140:612-614]
45. [Khraiwesh B, et al. Transcriptional control of gene expression by microRNAs. *Cell*. 2010;140: 112-122]
46. [Gonzalez S, Pisano DG, Serreno M. Mechanistic principles of chromatin remodeling guided by siRNAs and miRNA. *Cell Cycle*. 2008;7:2601-2608].
47. [Kim DH, Saetrom P, Snove O Jr, Rossi JJ. MicroRNA directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:16230-16235]
48. [Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequence, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res*. 2006; 34:D140-4].
49. [Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, et al. A uniform system for microRNA annotation. *RNA*. 2003; 9:277-9].
50. [Bartels CL, Tsongalis GJ. MicroRNAs: Novel Biomarkers for Human Cancer. *Clin Chem*. 2009; 55(4): 623-31].

-
51. [Mellick R, Patnaik SK, Yendamuri S. *MicroRNAs and lung cancer: Biology and applications in diagnosis and prognosis. Journal of Carcinogenesis.* 2010; 9:8].
52. [Li C, Feng Y, Coukos G, and Zhang L. *Therapeutic MicroRNA Strategies in Human Cancer.* 2009; 11(4): 747-757].
53. [Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. *Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99(24):15524-9].
54. [Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D et al. *MicroRNA expression profiles classify human cancers. Nature.*2005; 435(7043):834-8]
55. [Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. *A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. Proc Natl acad Sci USA.* 2006; 103(7):2257-61].
56. [Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, Padua d, Wang Q, et al. *Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. Nature.* 2008; 451(7175):147-52].
57. [Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, et al. *A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med.* 2005; 353(17): 1793-801]
58. [Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, et al. *Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. Cancer Cell.* 2006; 9(3):189-98]
59. [Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. *Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105(30):10513-8].
60. [Calin GA. Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. *Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101(9):2999-3004]
61. [Metias SM, Lianidou E, Yousef GM. *MicroRNAs in clinical oncology: at the crossroads between promises and problems. J Clin Pathol* 2009; 62:771-776].
62. [Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, et al. *microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103(24):9136-41].
63. [Sethupathy P, Collins FS. *MicroRNA target site polymorphisms and human disease. Trends Genet.* 2008; 24(10):489-97].

-
64. [Saito Y, et al. Specific activation of microRNAs-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell*. 2006; 9:435-443].
65. [Scott GK, Mattie MD, Berger CE, Benz SC, Benz CC. Rapid alteration of microRNA levels by histone deacetylase inhibition. *Cancer Res*. 2006; 66(3):1277-81].
66. [Merritt WM, Lin YG, Han LY, Kamat AA, Spannuth WA, Schmandt R, et al. Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer. *N Engl J Med*. 2008; 359(25):2641-50]
67. [Karube Y, Tanaka H, Osada H, Tomida S, Tatematsu Y, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci*. 2005; 96(2): 111-5].
68. [Kawahara Y. et al. Redirection of silencing targets by adenosine-to-inosine editing of miRNAs. *Science* 315 (2007) 1137-1140.]
69. [Luciano DJ, Mirsky H, Vendetti NJ, Maas; RNA editing of a miRNA precursor. *RNA*. 2004;10(8):1174-7] [Kawahara Y. et al. Frequency and fate of microRNA editing in human brain. *Nucleic Acids Res*. 36 (2008) 5270-5280.]
70. [Luciano DJ, Mirsky H, Vendetti NJ, Maas S. RNA editing of a miRNA precursor. *RNA*. 2004; 10(8):1174-7]
71. [Kawahara Y, Zinshteyn B, Chendrimada TP, Shiekhata R, Nishikura K. RNA editing of the microRNA-151 precursor blocks cleavage by the Dicer-TRBP complex. *EMBO Rep*. 2007; 8(8): 763-9].
72. [Habig J.W. et al. MiRNA editing-we should have inosine this coming. *Mol. Cell* 25 (2007) 792-793.]
73. [Ohman M. A-to-I editing challenger or ally to microRNA process. *Biochimie* 89 (2007) 1171-1176.]
74. [Hartner JC, Schmittwolf C, Kispert A, Muller AM, Higuchi M, Seeburg PH. Liver disintegration in the mouse embryo caused by deficiency in the RNA-editing enzyme ADAR1. *J Biol Chem*. 2004; 279(6):4894-902]
75. [Wang Q, Khillan J, Gradue P, Nishikura K. Requirement of the RNA editing deaminase ADAR1 gene for embryonic erythropoiesis. *Science*. 2000; 290(5497):1765-8].
76. [Feng Y, Sansam CL, Singh M, Emeson RB. Altered RNA editing in mice lacking ADAR2 autoregulation. *Mol Cell Biol*. 2006; 26(2):480-8]
77. [Paz N, Ievanion EY, Amariglio N, Heimberger AB, Ram Z, Costantini S, et al. Altered adenosine-to-inosine RNA editing in human cancer. *Genome Res*. 2007; 17(11):1586-95].

-
78. [Costinean S, Zaneni N, Pekarsky Y, Tili E, Volinia S, Heerema N, et al. *Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. Proc Natl Acad Sci USA. 2006; 103(18):7024-9*].
79. [Eis PS, Tam W, Sun L, Chadburn A, li Z, Gomez MF, et al. *Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. Proc Natl Acad Sci USA. 2005; 102(10):3627-32*].
80. [He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, et al. *A microRNA polycistronic as a potential human oncogene. Nature. 2005; 435(7043): 828-33*]
81. [O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. *C-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. Nature. 2005; 435(7043):839-43*].
82. [Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. *MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. Cancer Res. 2005; 65(14):6029-33*].
83. [Krichevsky AM, Gabriely G. *miR-21: a small multi-faceted RNA. J Cell Mol Med.2009; 13(1):39-53*].
84. [Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, Gillis AJ, Stoop H, Nagel R, et al. *A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. Cell. 2006; 124(6):1169-81*].
85. [Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. *RAS is regulated by the let-7 microRNA family. Cell.2005; 120(5):635-47*]
86. [Borel C, Antonarakis SE. *Functional genetic variation of human miRNAs and phenotypic consequences. Mamm Genome. 2008; 19:503-509*].
87. [Zeng Y, Cullen BR. *Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. J Biol Chem. 2005; 280:27595-27603*].
88. [Zeng Y, Yi R, Cullen BR. *Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. EMBO J. 2005; 138-148*]
89. [Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, et al. *Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. Cell.2008;125:887-901*].
90. [Duan R, Pak C, jin P. *Single nucleotide polymorphism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA. Hum Mol Genet. 2007;16:1124-1131*].
91. [Saunders MA, Liang H, Li WH. *Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. Proc Natl Acad Sci USA. 2007; 104:3300-3305*].
92. [Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, Jarzab B, Schoenberg DR, et al. *Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predispose to papillary thyroid carcinoma. Proc Natl Acad Sci USA. 2008; 105:7269-7274*].

-
93. [Cummins JM, He Y, Leary RJ Pagliarini R, Diaz LA Jr, et al. The colorectal microRNAome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103:813-818].
94. [Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol*. 2002; 12: 735-739].
95. [Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*. 2007; 129: 1401-1414].
96. [Morin RD, O' Connor MD, Griffith M, Kuchenbauer F, Delaney A, et al. application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. *Genome Res*. 2008; 18: 610-621].
97. [Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*. 2007; 448:83-86].
98. [Wu H, Neilson JR, Kumar P, Manocha M, Shankar P, et al. miRNA profiling of naïve, effector and memory CD8 T cells. *PLoS ONE*. 2007; 2:e1020].
99. [Landraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*. 2007; 129: 1401-1414].
100. [Chen K, Rajewsky N. Natural selection on human microRNA binding sites inferred from SNP data. *Nat Genet*. 2006; 38:1452-1456].
101. [Bao L, Zhou M, Wu L, Goldowitz D, et al. PolymiRTS Database: linking polymorphism in micro RNA target sites with complex traits. *Nucleic Acids Res*. 2007; 35:D51-D54].
102. [Georges M, Coppieters W, Charlier C. Polymorphic miRNA-mediated gene regulation: contribution to phenotypic variation and disease. *Curr Opin Genet Dev*. 2007; 17:166-176].
103. [Saunders MA, Liang H, Li WH. Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104: 3300-3305].
104. [Conne B, Strutz A, Vassalli JD. The 3' untranslated region of messenger RNA: a molecular "hotspot" for pathology? *Nat Med*. 2000; 6:637-41].
105. [Mishra PJ, Banerjee D, Bertino JR. MiRSNPs or MIR-polymorphisms, new players in microRNA mediated regulation of the cell. *Cell Cycle*. 2008; 7:853-858].
106. [Guil S and Manel Esteller. DNA methylomes, histone codes and miRNAs: tying it all together. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008].
107. [Weber B, Stresemann C, Bruckner B, Lyko F. Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle*. 2007; 6:1001-5].
108. [Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell*. 2007;128:683-92]
109. [Iorio MV, Visone R, Di Leva G, Donati V, Petrocca F, Casalini P, et al. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res*. 2007; 67:8699-707]

-
110. [Lujambio A, Rospero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setién F, et al. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res.* 2007a;67:1424-9]
111. [Lujambio A, Esteller M. CpG island hypermethylation of tumor suppressor microRNAs in human cancer. *Cell Cycle.* 2007b;6:e1-4].
112. [Lehmann U, Hasemeier M, Christgen M, Muller M, Romermann D, Langer F, et al. Epigenetic inactivation of microRNA gene has-mir-9-1 in human breast cancer. *J Pathol.* 2008; 214:17-24].
113. [Lujambio A, and Esteller M. How epigenetics can explain human metastasis: a new role for microRNAs. *Cell Cycle.* 2009; 8: 377-382].
114. [Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, Rospero, Sanchez-Cespedes M, Blanco D, Montuenga LM, Rossi N, Nicoloso MS, Faller WJ, Gallagher WM, Eccles SA, Croce CM and Esteller M. A microRNA DNA methylation signatures for human cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105: 13556-13561].
115. [Brandi N, Davis-Dusenbery and Hata A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *J Biochem.* 2010; 148(4):381-392].
116. [Drummond DC, Noble CO, Kirpotin DB, Guo Z, Scott GK, Benz CC. Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents, *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005;45:495-528].
117. [Guil S and Esteller M. DNA methylomes, histones codes and miRNAs: Tying it all together. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(1):87-95].
118. [Fazi F, Racanicchi S, Zardo G, Starnes LM, Manzini M, Travaglini L, et al. Epigenetic silencing of the myelopoiesis regulator microRNA-223 by the AML/ETO onco-protein. *Cancer Cell.* 2007;12:457-66].
119. [Garzon R, Marcucci G and Croce M. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nature Reviews.* 2010; 9:775-789].
120. [Weiler J, Hunziker J, Hall J. Anti-miRNA oligonucleotides (AMOs): ammunition to target miRNAs implicated in human disease? *Gene Ther.* 2006; 13(6):496-502]
121. [Elmen J, Lindow M, Schultz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, et al. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature.* 2008; 452(7189):896-9]
122. [Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene.* 2007; 26(19):2799-803].
123. [Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat Methods.* 2007; 4(9):721-6].

-
124. [Xiao J, Yang B, Lin H, Lu Y, Luo X, Wang Z. Novel approaches for gene-specific interference via manipulating actions of micro-RNAs: examination on the pacemaker channel genes *HCN2* and *HCN4*. *J Cell Physiol.* 2007;212(2):285-92].
125. [Kumar MS, Erkeled SJ, Pester RE, Chen CY, Ebert MS, Sharp PA, et al. Suppression of non-small cell lung tumor development by the *let-7* microRNA family. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(10):3903-8].
126. [Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, et al. *miR-15* and *miR-16* induce apoptosis by targeting *BCL2*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(39):13944-9].
127. [Bonci D, Coppola V, Musumeci M, Addario A, Giuffrida R, Memeo L, et al. The *miR-15a-miR-16-1* cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nat Med.* 2008; 14(11):1271-7].
128. [Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, Wentzel EA, Montgomery CL, Hwang H-W, et al. Therapeutic microRNA Delivery Suppresses Tumorigenesis in a Murin Liver Cancer Model. *Cell.* 2009;137(6):1005-17].
129. [Akinc A, Zumbuehl A, Goldberg M, Leshchiner ES, Busini V, Hossain N, et al. A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics. *Nat Biotechnol.* 2008; 26(5):561-9].
130. [Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, Jarzab B, Schoenberg DR and de la Chapelle A. Common SNP in pre-*miR-146a* decrease mature *miR* expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *PNAS.* 2008; 105(20): 7269-7274].
131. [Taganov KD, Boldin MP, Chang KL, Baltimore D. NF- κ B-dependent induction of microRNA *miR-146*, an inhibitor target to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103:12481-12486].
132. [He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S, Calin GA, Liu CG, Franssila K, Suster S, Kloos RT, Croce CM, de la Chapelle A. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *PNAS.* 2005; 102(52):19075-19080].
133. [Taganov KD, Boldin MP, Baltimore D. MicroRNAs and immunity: Tiny players in big field. *Immunity.* 2007; 26:133-137].
134. [Cameron JE, et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces cellular microRNA *miR-146a*, a modulator of lymphocyte signaling pathways. *J Virol.* 2008; 82:1946-1958].
135. [Karin M, Lin A. NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nat Immunol.* 2002; 3:221-227].

136. [Jazdewsky K, Liyanarachchi S, Swierniak M, Pachicki J, Ringeld M, Jarzab B, de la Chapelle A. Polymorphic mature microRNAs from passenger strand of pre-miR-146a contribute to thyroid cancer. *PNAS*. 2009; 106(5):1502-1505].
- 137.[O'Connell RM, Taganov KD, Bolding MP, Cheng G, Baltimore D. MicroRNA 155 is inducing during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:1604-09]
138. [Sheedy FJ, O'Neill LA. Adding fuel to fire: microRNA as a new class of mediators of inflammation. *Ann Rheum Dis*. 2008; 67(3):50-5]
139. [Nakasa T, Miyaki S, Okubo A, Hashimoto M, Nishida K, Ochi M, Asahara H. Expression of MicroRNA-146 in Rheumatoid Arthritis Synovial Tissue. *Arthritis & Rheumatism*. 2008; 58(5): 1284-1292].
140. [Jones SW, Watkins G, Le Good N, Roberts S, Murphy CL, Brockbank SM, Needham MR, Read SJ, Newham P. The identification of differentially expressed microRNA in osteoarthritis tissue that modulate the production of TNF-alpha and MMP13. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17(4):464-72].
141. [Goldring MB, Birkhead J, Sandell LJ, Kimura T, Krane SM. Interleukin 1 suppresses expression of cartilage-specific types II and IX collagens and increases types I and III collagens in human chondrocytes. *J Clin Invest*. 1988; 82:2026-37].
142. [Yamasaki K, Nakasa T, Miyaki S, Ishikawa M, Deie M, Adachi N, Yasunaga Y, Asahara H, Ochi M. Expression of MicroRNA-146a in Osteoarthritis Cartilage. *Arthritis & Rheumatism*. 2009; 60(4): 1035-1041].
143. [Tang Y, Luo X, Cui H, Ni X, Yuan M, Guo Y, et al. MicroRNA-146a contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. *Arthritis Rheum*. 2009;60:1065-75].
144. [Bellon M, Lepelletier, HErmine O, Nicot C. Deregulation of microRNA involved in hematopoiesis and the immune response in HTLV-I adult T-cell leukemia. *Blood*. 2009; 113(20):4914-4917].
145. [Yamano Y, Takenouchi N, Li Hc, et al. Virus-induced dysfunction of CD4+CD25+ T cells in patients with HTLV-I associated neuroimmunological disease. *J Clin Invest*. 2005; 115:1361-1368].
146. [Shen J, Yang X, Xie B, Chen Y, Swaim M, Hackett S, Campochiaro PA. MicroRNAs Regulate Ocular Neovascularization. *Molecular Therapy*.2008;16(7):1208-16].
147. [Ji R, Cheng Y, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H, et al. MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of microRNA in vascular neointimal lesion formation. *Clin Res*. 2007; 100:1579-1588].

-
148. [Shen J, Aambrosone C, Dicioccio RA, Odunsi K, Lele SB, Zhao H. *a functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis. Carcinogenesis.* 2008; 29(10): 1963-1966].
149. [Hurst DR, Edmonds MD, Scott GK, Benz CC, Vaidya KS, Welch DR. *Breast cancer metastasis suppressor 1 up-regulates miR-146, whic suppresses breast cancer metastasis. Cancer res.* 2009. 69(4):1279-83].
150. [Gao LB, Bai P, Pan XM, Jia Jing, Li LJ, et al. *The association between two polymorphisms in pre-miRNAs and breast cancer risk: a meta-analysis. Breast Cancer Res treat.* 2010; in press.].
151. [Labbaye C, Spinello I, Quaranta MT, Pelosi E, Pasquini L, Petrucci E, Biffoni M, Nuzzolo ER, Billi M, Foà R, Brunetti E, Grignani F, Testa U, Peschle C. *A three-step pathway comprising PLZF/miR-146a/CXCR4 controls megakaryopoiesis. Nature Cell Biology.* 2008; 10(7):788-801].
152. [Lin SL, Chiang A, Chang D, Ying SY. *Loss of mir-146a function in hormone-refractory prostate cancer. RNA.* 2008; 14:417-424].
153. [Lin SL, Chang D, Ying SY. *Hyaluronan stimulates transformation of androgen-independent prostate cancer. Carcinogenesis.* 2007;28:310-320].
154. [Chim SSC, Shin TKF, Hung ECW, Leung Ty, Lau Tk, Chiu RWK, Lo YMD. *Detection and Characterization of Placental MicroRNAs in Maternal Plasma. Clinical Chemistry.* 2008; 54(3):482-490].
155. [Hariharan M, Scaria V, Pillai B, Brahmachari SK. *Targets for human encoded microRNAs in HIV genes. [Biochem Biophys Res Commun.* 2005;337:1214-1218].
156. [Wong TS, Liu XB, Wong BYH, Ng RWM, Yuen APW, Wei WI. *Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cel Carcinoma of Tongue. Human Cancer Biology.* 2008. 14(9): 2588-2592].
157. [Liu H, Brannon AR, Reddy AR, Alexe G, Seiler MW, Arreola A, et al. *BMC Systems Biology.* 2010; 4:51].
158. [Liu X, Wang T, Wakita T, Yang W. *Systematic identification of microRNA and messenger RNA profiles in epatiti C virus-infected human hepatoma cells. Virology.* 2010; 398:57-67].
159. [Andrieux J, Demory JL, Dupriez B, et al. *Dysregulation and overexpression of HMGA2 in myelofibrosis with myeloid metaplasia. Genes Chromosomes Cancer.* 2004; 39:82-87].
160. [Andrieux J, Bilhou- Nabera C, Lippert Ee, et al. *Expression of HMGA2 in PB leukocytes and purified CD34+ cells from controls and patients with Myelofibrosis and myeloid metaplasia. Leuk Lymphoma.* 2006;47:1956-1959].

-
161. [Guglielmelli P, Tozzi L, Pancrazzi A, Bogani C, et al. *MicroRNA expression profile in granulocytes from primary myelofibrosis patients. Experimental Hematology.* 2007; 35:1708-1718].
162. [Krumlauf R. *Hox genes in vertebrate development. Cell.* 1994; 78(2):191-201].
163. [Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A, Tuschli T. *New microRNAs from mouse and human. RNA.* 2003;9(2):175-9].
164. [Lim LP, Glasner ME, Yetka S, Burge CB, Bartel DP. *Vertebrate microRNA genes. Science.* 2003; 299(5612):1540].
165. [Yekta S, Shin Ih, Bartel D. *MicroRNA-Directed Cleavage of HOXB8 mRNA. Science.* 2004;304:594-596].
166. [Kawasaki H, Taira K. *MicroRNA-196 inhibits HOXB8 expression in myeloid differentiation of HL60 cells. Nucleic Acids Symp Ser (Oxf).* 2004;48:211-2].
167. [Li Y, Zhang M, Chen H, Dong Z, Ganapathy V, et al. *Ratio of miR-196s to HOXC8 Messenger RNA correlates with Breast Cancer Cell Migration and Metastasis. Cancer Res.* 2010; 70(20):7894-7904].
168. [Pedersen IM, Cheng G, Wieland S, Volinia S, Croce CM, Chisari FV, et al. *Interferon modulation of cellular microRNA as an antiviral mechanism. Nature.* 2007; 449:919-22].
169. [Pedersen I, David M. *MicroRNAs in the immune response. Cytokine.* 2008; 43:391-394].
170. [Tkachuk DC, Kohler S, Cleary ML. *Involvement of a homolog of Drosophila trithorax by 11q23 chromosomal translocations in acute leucemia. Cell.* 1992; 71:691-700].
171. [Ziemin-van der Poel S, McCabe NR, Gill HJ, et al. *Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leucemia. Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:10735-10739].
172. [Popovic R, Riesbeck LE, Velu CS, Chaubey A, Zhang J, Achille NJ. *Regulation of mir-196b by MLL and its overexpression by MLL fusions contributes to immortalization. Blood.* 2009;113(14):3314-22].
173. [Debernardi S, Skoulakis S, Molloy G, et al. *MicroRNA miR-181a correlates with morphological sub-class of acute myeloid leukemia and the expression of its target genes in global genome-wide analysis. Leukemia.* 2007. 21(5):912-916].
174. [Iorio MV, et al. *MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. Cancer Res.* 2005; 65:7065-7070].
175. [Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, et al. *MicroRNA expression pattern to differenziare pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. JAMA.* 2007; 297(17):1901-1908].

176. [Hu Z, Chen J, Tian T et al. Genetic variations of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival. *J Clin Invest.* 2008a;118(7):2600-2608]
177. [Hu Z, Liang J, Wang Z et al. Common genetic variations in pre-microRNA were associated with increase risk of breast cancer in Chinese women. 2008b; 30(1)79-84]
178. [Tian T, Shu Y, Chen J, et al. A functional genetic variation in microRNA-196a2 is associated with increase susceptibility of lung cancer in Chinese. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(4):1183-1187].
179. [Qi P, Dou Th, Geng L, Zhou Fg, Gu X, Wang H, Gao Cf. Association of variant in MIR 196A2 with susceptibility to hepatocellular carcinoma in ale Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hum Immunol.* 2010;71(6):621-6].
180. [Dou T, Wu Q, Chen X, Ribas J, Ni, X, Tang C, Huang F, et al. A polymorphism of microRNA 196a genome region was associated with decreased risk of glioma in Chinese population. *J Cancer Res Oncol.* 2010;136(12):1853-9].
181. [Wagner W, Horn P, Castoldi M, Diehlmann A, Bork S, Saffrich R, Benes V, Blake J, et al. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PloS ONE* 3. 2008; 3(5):e2213].
182. [Sluijter JPG, van Mil A, van Vliet P, Metz CHG, Liu J, Doevendans PA, Goumaans MJ. MicroRNA-1 and -499 Regulate Differentiation and Proliferation in Human-Derived Cardiomyocyte Progenitor Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 39(4):859-68].
183. [Adachi T, Nakanishi M, Otsuka Y, Nishimura K, Hirokawa G, Goto Y, Nonogi H, Iwai N. Plasma miRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction. *Clin Chem.* 2010;56(7):1183-5. Epub 2010 Apr 15.].
184. [Hu Z, Chen X, Zhao Y, Tian T, Jin G, Shu Y, Chen Y, Xu L, Zen K, Zhang C, Shen H. Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2010; 28(10)1721-6].
185. [Xu J, Hu Z, Xu ZF, Gu H, Yi L, Cao H, Chen J, et al. Functional Variant in microRNA-196a2 Contributes to the Susceptibility of Congenital Heart Disease in a Chinese Population. *Hum Mutat.* 2009;30(8):1231-6].
186. [Catucci I, Yang R, Verderio P, Pizzamiglio S, Heesen L, et al. Evaluation of SNPs in miR-146a, miR196a2 and miR-499 as Low-penetrance Alleles in German and Italian Familial Breast Cancer Cases. *Hum Mutat.* 2010;31(1):E1052-7].
187. [Stewart BW and Kleihues P. *World Cancer Report.* IARC Press. 2003; 12-14].
188. [Wu X, Piper-Hunteer MG, Crawford M, Nuovo GJ, Marsh CB, Otterson GA and Nana-Sinkam SP. MicroRNAs in the Pathogenesis of Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2009; 4(8): 1028-1034].

-
189. [Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. *Cancer statistics. CA Cancer J Clin.* 2009; 59:225-49].
190. [Ginsberg M.S., Grewal R.K., Heelan R.T. *Lung Cancer. Radiol Clin N Am.* 2007; 45 : 21-43]
191. [Stewart BW and Kleihues P. *World Cancer Report. IARC Press.* 2003; 12-14].
192. [Stewart BW and Kleihues P. *World Cancer Report. IARC Press.* 2003; 22-25].
193. [Stewart BW and Kleihues P. *World Cancer Report. IARC Press.* 2003; 182-186]
194. [Stewart BW and Kleihues P. *World Cancer Report. IARC Press.* 2003; 35-36].
195. [DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer: Principles & Practice of Oncology. Lippincott-Raven. 5th Edition 1997; C.30.1: 854].*
196. [Robert J. Ginsberg, Everett E. Vokes, Adam Raben. *Cancer of the lung: 859-869 in DeVita V.T. Jr., Hellman S., Rosenberg S.A. editors Cancer: Principles & Practice of Oncology, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1997.]*
197. [Robert J. Ginsberg, Everett E. Vokes, Adam Raben. *Cancer of the lung: 911-912 in DeVita V.T. Jr., Hellman S., Rosenberg S.A. editors Cancer: Principles & Practice of Oncology, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1997].*
198. [Lebanony D, Benjamin H, Gilad S, Ezagouri M, Dov A, Ashkenazi K, et al. *Diagnostic assay based on has-miR-205 expression distinguishes squamous from nonsquamous non-small-cell lung carcinoma. Journal of Clinical Oncology.* 2009; 27: 2030-2037].
199. [Lin PY, Yu SL, Yang PC: *MicroRNA in lung cancer. British Journal of Cancer.* 2010;103:1144-1148].
200. [Liang Y. *An expression meta-analysis of predicted microRNA targets identifies a diagnostic signatures for lung cancer. BMC Med Genomics.* 2008; 1:61].
201. [Du L, Pertsemlidis A. *microRNAs and lung cancer: tumors and 22-mers. Cancer metastasis Rev.* 2010; 29: 109-122]
202. [Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, Rosenwald S, Spector Y, Zepeniuk M, et al. *MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. Nat Biotechnol.* 2008; 26: 462-9]
203. [Mallick R, Patnaik SK, Yendamuri S. *MicroRNAs and lung cancer: Biology and applications in diagnosis and prognosis. Journal of Carcinogenesis.* 2010; 9:8].
204. [Bandi N, Zbinden S, Gugger M, Arnold M, Kocher V, Hasan L, et al. *miR-15a and miR-16 are implicated in cell cycle regulation in a Rb-dependent manner and are frequently deleted or down-regulated in non-small cell lung cancer. Cancer Res.* 2009; 69:5553-9].
205. [Seike M, Goto A, Okano T, Bowman ED, Schetter AJ, Horikawa I, et al. *MiR-21 is an EGFR-regulated anti-apoptotic factor in lung cancer in never-smokers. Proc Natl Acad USA.* 2009; 106:12085-90].

-
206. [Navarro A, Marrades RM, Vinolas N, Quera A, Agusti C, Huerta a, et al. *MicroRNAs esprese during lung cancer developmment are esprese in human pseudoglandular lung embryogenesis. Oncology. 2009;76:162-9].*
207. [Raponi M, Dossey L, Jatkoe T, Wu X, Chen G, Fan H, et al. *MicroRNA classifiers for predicting prognosis of squamous cell lung cancer. Cancer Res. 2009; 69:5776-83].*
208. [Yu L, Todd NW, Xing L, Xie Y, Zhang H, Liu Z, et al. *Early detection of lung adenocarcinoma in sputum by a panel of microRNA markers. Int J Cancer. 2010. In press].*
209. [Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, et al. *Reduced expression of the let-7 microRNAs in lung cancers in association with shortened postoperative survival. Cancer Res. 2004; 64:3753-66]*
210. [Patnaik SK, Kannisto E, Knudsen S, Yendamuri S. *Evolution of MicroRNA expression profiles that may predict recurrence of localized stage I Non-Small Cell Lung Cancer after Surgical Resection. Cancer Res. 2010; 70:36-45].*
211. [Landi MT, Zhao Y, Rotunno M, Koshiol J, Liu H, Bergen AW, et al. *MicroRNA expression differentiates histology and predicts serviva of lung cancer. Clin Cancer Res. 2010; 16:430-41].*
212. [Izzotti A, Calin GA, Arrigo P, Steele VE, Croce CM, De Flora S. *Downregulation of microRNA expression in the lungs of rats exposed to cigarette smoke. FASEB J. 2009;23(3):806-12].*
213. □Izzotti A, Bagnasco M, Cartiglia C, Longobardi M, Balansky RM, Merello A, Lubet RA, De Flora S. *Chemoprevention of genome, trascriptome, and proteome alterations induced by cigarette smoke in rat lung. Eur J Cancer. 2005; 41:1864-1874].*
214. [Johnson CD, Esquela-Kerscher A, Stefani G, Byrom M, Kelnar K, Ovcharenko D, Wilson M, Wang X, Shelton J, Shingara J, Chin L, brown D, Slack FJ. *The let-7 microRNA repress cell proliferation pathways in human cells. Cancer Res. 2007; 67:7713-7722]*
215. [He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, Xue W, Zender L, Magnnus J, Ridzon D, Jackson AL, Linsley PS, Chen C, Lowe SW, Cleary MA, Hannon GJ. *A microRNA component of the p53 timor suppressor network. Nature. 2007;447:1130-1134].*
216. ;[Kuehbach A, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. *Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. Circ Res. 2007;101:59-68]*
217. [Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, Lee KH, Feldmann G, Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ, Arking DE, Beer MA, Maitra A, Mendell JT. *Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. Mol Cell. 2007;26:745-752].*

218. [Fujimoto N, Wislez M, Zhang J, Iwanaga K, Dackor J, et al. High expression of ErbB family members and their ligands in lung adenocarcinomas that are sensitive to inhibition of epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.* 2005; 65: 11478-11485].
219. [Weiss GJ, Bemis LT, Nakajima E, Sugita M, Birks DK, Robinson WA, et al. EGFR regulation by microRNA in lung cancer: Correlation with clinical response and survival to gefitinib and EGFR expression in cell lines. *Ann Oncol.* 2008; 19:1053-9].
220. [Chin LJ, Ratner E, Leng S, Zhai R, Nallur S, Babar I, et al. A SNP in let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk. *Cancer Res.* 2008; 68:8535-40].
221. [Travis WD, Colby TV. *Classificazione istologica internazionale dei tumori 3rd ed.* Geneva, Switzerland: Springer/ World Health Organization; 1999.]
222. [UICC. *TNM Classificazione dei tumori maligni.* Berlino: Springer-Verlag, 1987; 69-73]
223. [Rozen S, Skaletsky HJ. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S, eds. *Bioinformatics Methods and protocols: Methods in Molecular Biology.* Totowa, NJ : Human Press; 2000: 365-386. Source code available at <http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>. Accessed January 2007.]
224. *Primer Blast:* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>
225. [Livak et al. Analysis of relative gene expression data using Real time quantitative PCR and $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 25, 402-408, 2001.]
226. [Neri G, Genuardi M. *Genetica umana e medica.* Elsevier Masson. 2007; 97-109].
227. [Croce CM. *Oncogenes and Cancer.* *N Engl J Med* 2008; 31: 358(5):502-511.]
228. [Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. *Global cancer statistics, 2002.* *CA Cancer J Clin.* 2005; 55:74-108].
229. [Jemal A, Siegel R, et al. *Cancer statistics, 2008.* *CA Cancer J Clin.* 2008; 58:71-96]
230. [Schee K, Fodstad O, Flatmark K. *MicroRNA as Biomarkers in Colorectal Cancer.* *Am J Path.* 2010; 177(4):1592-98].
231. [Chen X, Guo X, Zhang H, Xiang Y, Chen J, Yin Y, Cai X, et al. *Role of miR-143 targeting in KRAS in colorectal tumorigenesis.* *Oncogene.* 2009; 28:1385-1392]
232. [Jiang SX, Wang XS, Geng CH, Wang GY. *Altering trend of clinical characteristics of colorectal cancer: a report of 3,607 cases.* *Chin J. Cancer.* 2009; 28:54-56].
233. [Wu WKK, Law PTY, Lee CW, Cho CH, Fan D, et al. *MicroRNA in colorectal cancer: from benchtop to bedside.* *Carcinogenesis.* 2010; Epub ahead of print].
234. [Robert J. Ginsberg, Everett E. Vokes, Adam Raben. *Cancer of the lung: 1148-1168 in DeVita V.T. Jr., Hellman S., Rosenberg S.A. editors Cancer: Principles & Practice of Oncology, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1997.*]

235. [Markowitz SD, Bertagnolli MM. *Molecular Basis of Colorectal Cancer*. *N Engl J Med*. 2009;361:2449-60].
236. [Kinzler KW, Vogelstein B. *Colorectal tumors*. In: Vogelstein B, Kinzler KW, eds. *The genetic basis of human cancer*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill. 2002;583-612]
237. [Grady WM, Markowitz S. *Colorectal cancer: genetic alterations*. In: Kelsen D, Daly J, Kern S, Levin B, Tepper J, eds. *Gastrointestinal oncology: principles and practice*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2002:685-702]
238. [Fearon ER, Bommer GT. *Molecular biology of colorectal cancer*. In DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA, eds. *DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer: principles & practice of oncology*. Vol.1 Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2008:1218-31].
239. [Barber TD, McManus K, Yuen KW, et al. *Chromatoid cohesion defects may underlie chromosome instability in human colorectal cancers*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:3443-8].
240. [Leary RJ, Cummins J, et al. *Integrated analysis of homozygous deletions, focal amplifications, and sequence alterations in breast and colorectal cancers*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:16224-9]
241. [Issa JP, *CpG Island methylator phenotype in cancer*. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4:988-93]
242. [Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, et al. *CpG island methylator phenotype in colorectal cancer*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:8681-6],
243. [Kondo Y, Issa JP, *Epigenetic changes in colorectal cancer*. *Cancer Metastasis Rev* 2004;23:29-39]
244. [Lynch HT, Lynch JF, Lynch PM, Attard T. *Hereditary colorectal cancer syndromes: molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management*. *Fam Cancer*. 2008; 7:27-39].
245. [Goss KH, Groden J. *Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor*. *J. Clin Oncol*. 2000;18:1967-79].
246. [Korinek V, Barker N, Morin PJ, et al. *Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma*. *Science*. 1997; 275:1784-7]
247. [Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, et al. *Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas*. *Science*. 1989;244:217-21].
248. [Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK, Vogelstein B. *Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53*. *Science* 1990;249:912-5].
249. [Nosho K, Irahara N, Shima K, et al. *Comprehensive biostatistical analysis of CpG Island methylator phenotype in colorectal cancer using a large population based sample*. *PLoS One*. 2008;3(11):e3698]

250. [Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature*:1987;327:293-7
251. [Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417:949-54].
252. [Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, et al. Tumorigenesis:RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature*. 2002;418:934]
253. [Siena S, Sartore-Bianchi A, Di Nicol-Antonio F, et al. Biomarkers predicting clinical out come of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009; 101:1304-24].
254. [Kim MS, Oh JE, Kim YR, Park SW, Kang MR, kim SS, Ahn CH, Yoo NJ and Lee SH. Somatic mutations and losses of expression of microRNA regulation-related genes AGO2 and TNRC6A in gastric and colorectal cancers. *J Pathol*. 2010; 221:139-46]
255. Tsuchiya N, Ochiai M, Nakashima K, Ubagai T, Sugimura T, Nakagama H. *SND1*, a component of RNA-induced silencing complex, is up-regulated in human colon cancers and implicated in early stage colon carcinogenesis. *Cancer Res*. 2007; 67:9568-76].
256. [Calcagno SR, Li S, Colon M, Kreinest PA, Thompson EA, Field AP e Murray NR. Oncogenic K-ras promotes early carcinogenesis in the mouse proximal colon. *Int J Cancer*. 2008;34:518-21]
257. [Brink M, de Goeij AF, Weijenberg MP, Roemen GM, Lentjes MH, et al. K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis*. 2003; 703-10]
258. [Kressner U, Bjorheim J, Westring S, Wahlberg SS, et al. Ki-ras mutations and prognosis in colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 1998; 34:518-21].
259. [Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells. *Biol Pharm Bull*. 2006; 29:903-6]
- 260.[Fang WJ, Lin CZ, Zhang HH, Qian J, Zhong L, Xu N. Detection of let-7a microRNA by real-time PCR in colorectal cancer: a single-centre experience from China. *J Int Med Res*. 2007; 35:716-23]
261. Earle JS, Luthra R, Romans a, Abraham R, Ensor J, Yao H, Hamilton SR. Association of microRNA expression with microsatellite instability status in colorectal adenocarcinoma. *J Mol Diagn*. 2010,12:433-40].
262. [Slaby O, Svoboda M, Fabian P, Smerdova T, Knoflickova D, Bednarikova M, et al. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology*. 2007; 72:397-402].

-
263. [Akao Y, Nakagawa Y, Hirata I, Ilio A, Itoh T, et al. Role of anti-oncomirs mir-143 and -145 in human colorectal tumors. *Cancer Gene Ther.* 2010; 17:398-408]
264. [Kulda V, Pesta M, Topolcan O, Liska V, Treska V, et al. Relevance of miR-21 and miR-143 expression in tissue samples of colorectal carcinoma and its liver metastases. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010; 200:154-60]
265. [Wang CJ, Zhou ZG, Wang L, et al. Clinicopathological significance of microRNA-31, -143 and -145 expression in colorectal cancer. *Dis Markers.* 2009;26:27-34]
266. Michael MZ, van Holst Pellekaan NG, Young GP, et al. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res.* 2003;1:882-91]
267. [Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. MicroRNAs 143 and 145 are possible common onco-microRNAs in human cancers. *Oncol Rep.* 2006; 16:845-50].
268. [Ng EK, Tsang WP, Ng SS, et al. MicroRNA-143 targets DNA methyltransferases 3A in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2009;101:699-706].
269. [Borralho PM, Kren BT, Castro RE, et al. microRNA-143 reduces viability and increases sensitivity to 5-fluorouracil in HCT116 human colorectal cancer cells. *FEBS J.* 2009;6689-700].
270. [Tsang WP, Kwok TT. The miR-18*a microRNA functions as a potential tumor suppressor by targeting on K-Ras. *Carcinogenesis.* 2009; 30:953-9].
271. [Rossi L, Bonmassar E, Faraoni I. Modification of miR gene expression pattern in human colon cancer cells following exposure to 5-fluorouracil in vitro. *Pharmacol Res.* 2007;56:248-53].
272. [Mishra PJ, Song B, Wang Y, Humeniuk R, et al. MIR-24 tumor suppressor activity is regulated independent of p53 and through a target site polymorphism. *PLoS One.* 2009;4:e8445].
- 273 [Braun CJ, Zhang X, Savelyeva I, Wolff S, et al. p53-Responsive micrornas 192 and 215 are capable of inducing cell cycle arrest. *Cancer Res.* 2008; 68:10094-104]
274. [Song B, Wang Y, Kudo K, Gavin EJ, et al. miE-192 Regulates dihydrofolate reductase and cellular proliferation through the p53-microRNA circuit. *Clin Cancer Res.* 2008; 14:8080-6]
275. [Boni V, Bitarte N, Cristobal I, Zarate R, et al. miR-192/miR-215 influence 5-fluorouracil resistance through cell cycle-mediated mechanisms complementary to its postranscriptional thymidilate synthase regulation. *Mol Cancer Ther.* 2010; 9:2265-75].
276. [Song B, Wang Y, Titmus MA, Botchkina G. Molecular mechanism of chemoresistance by miR-215 in osteosarcoma and colon cancer cells. *Mol Cancer.* 2010; 9:96]

277. [Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya m and Nakagama H. Tumor- suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad USA*. 2007; 104:15472-7]
278. [Hermeking H. p53 enters the microRNA world. *Cancer Cell*. 2007;12:414-8].
279. [Lodygin D, Tarasov V, Epanchintsev A, Berking C, et al. Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle*. 2008; 7:2591-600].
280. [Tsang WP, Ng EK, Ng SS, et al. Oncofetal H19-derived miR-675 regulates tumor suppressor RB in human colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 2010; 31:350-8].
281. [Shi B, Sepp-Lorenzino L, prisco M, et al. Micro RNA 145 targets the insulin receptor substrate-1 and inhibits the growth of colon cancer cells. *J Biol Chem*. 2007; 282:32582-90]
282. [La Rocca G, Badin M, Shi B, et al. Mechanism of growth inhibition by MicroRNA 145: the role of the IGF-I receptor signaling pathway. *J Cell Physiol*. 2009;220:485-91].
283. .[Creighton CJ, Casa A, Lazard Z, Huang S, et al. Insulin-like growth factor-I activates gene transcription programs strongly associated with poor breast cancer prognosis. *J Clin Oncol*. 2008:4078-85]
284. [Gregersen LH, Jacobsen AB, Frankel LB, et al. MicroRNA-145 targets YES and STAT1 in colon cancer cells. *PLoS One*. 2010;5:e8836]
285. [Zhang J, Guo H, Zhang H, et al. Putative tumor suppressor miR-145 inhibits colon cancer cell growth by targeting oncogene friend leukemia virus integration 1 gene. *Cancer*. 2011;117(1):86-95].
286. [Liu L, Chen l, Xu Y, et al. microRNA-195 promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity of human colorectal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;400:236-40].
287. [Nakano H, Miyazawa T, Kinoshita T, et al. Functional screening identifies a microRNA, miR-491 that induces apoptosis by targeting Bcl-X(L) in colorectal cancer cells. *Int J Cancer*. 2010; 127:1072-80].
288. [Hu G, Chen D, Li X, Yang K, et al. miR-133b regulates the MET proto-oncogene and inhibits the growth of colorectal cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther*. 2010;10:190-197]
289. [Grady WM, Parkin RK, Mitchell PS, Lee JH, et al. Epigenetic silencing of intronic microRNA has-miR-342 and its host gene EVL in colorectal cancer. *Oncogene*. 2008;27:3880-8].
290. [Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, et al. A microRNA signature of hypoxia. *Mol Cell Biol*. 2007;27:1859-67]

-
291. [Ma YL, Zhang P, Wang F, et al. Human embryonic stem cells and metastatic colorectal cancer cells shared the common endogenous human microRNA-26b. *J Cell Mol Med.* 2010; doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01170.x. [Epub ahead of print]
292. [Schimanski CC, Frerichs K, Rahman F, et al. High miR-196a levels promote the oncogenic phenotype of colorectal cancer cells. *World J Gastroenterol.* 2009; 15:2089-96]
293. [Yamamichi N, Shimomura R, Inada K, Sakurai K, et al. Locked nucleic acid in situ hybridization analysis of miR-21 expression during colorectal cancer development. *Clin Cancer Res.* 2009; 15:4009-16]
294. [Hu M, Xia M, Chen X, Lin Z, et al. MicroRNA-141 regulates Smad interacting protein 1 (SIP1) and inhibits migration and invasion of colorectal cancer cells. *Dig Dis Sci.* 2010;55:2365-72]
295. [Arndt GM, Dossey L, Cullen LM, et al. Characterization of global microRNA expression reveals oncogenic potential of miR-145 in metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2009;9:374].
296. [Burk U, Schubert J, Wellner U, et al. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep.* 2008;9:582-9].
297. [Boni V, Bitarte N, Cristobal I, Zarate R, et al. miR-192/miR-215 influence 5-fluorouracil resistance through cell cycle-mediated mechanisms complementary to its posttranscriptional thymidilate synthase regulation. *Mol Cancer Ther.* 2010; 9:2265-75].
298. [Valeri N, Gasperini P, Fabbri M, et al. Modulation of mismatch repair and genomic stability by miR-155. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107:6982-7].
299. [Illiopoulos D, Jaeger SA, et al. STAT3 activation of miR-21 and miR-181b-1 via PTEN and CYLD are part of the epigenetic switch linking inflammation to cancer. *Mol Cell.* 2010;39:493-506].
300. [Hunter MP, Ismail N, Zhang X, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One.* 2008;3:e3694]
301. [Kosaka N, Iguchi H and Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci.* 2010;101:2087-92]
302. [Ng EK, Chong WW, Jin H, et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut.* 2009; 58:1375-81].
303. [Huang Z, Huang D, Ni S, et al. plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2010;127:118-26].

-
304. [Link A, Balaguer F, Shen Y, et al. Fecal MicroRNAs as novel biomarkers for colon cancer screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19:1766-74].
305. [Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, et al. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA.* 2008;299:425-36]
306. [Schetter AJ, Nguyen GH, Bowman ED, et al. Association of inflammation-related and micro-RNA gene expression with cancer-specific mortality of colon adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2009;15:5878-87].
307. [Chen Y, Song Y, Wang Z, et al. Altered expression of MiR-148a and MiR-152 in gastrointestinal cancers and its clinical significance. *J Gastrointestinal Surg.* 2010;14:1170-9].
308. [Huang ZM, Yang J, Shen XY, et al. MicroRNA expression profile in non-cancerous colonic tissue associated with lymph node metastasis of colon cancer. *J Dig Dis.* 2009;10:188-94].
309. Xi Y, Formentini A, Chien M, Weir DB, et al. prognostic Values of microRNAs in Colorectal Cancer. *Biomark Insights.* 2006;2:113-121].
310. [Diaz R, Silva J, Garcia JM, et al. Deregulated expression of miR-106a predicts survival in human colon cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer.* 2008;47:794-802]
311. [Schepeler T, Reinert JT, Ostensfeld MS, Christensen LL, et al. Diagnostic and prognostic microRNAs in stage II colon cancer. *Cancer Res.* 2008;68:6416-24].
312. [Nakajima G, Hayashi K, Xi Y, et al. Non-coding microRNAs hsa-let-7g and hsa-miR-181b are Associated with Chemoresponse to S-1 in Colon Cancer. *Cancer Genomics Proteomics.* 2006; 3:317-324].
313. [Graziano F, Canestrari E, Ioupakakis F. Genetic modulation of the Let-7 micro-RNA binding to KRAS 3'-untranslated region and survival of metastatic colorectal cancer patients treated with salvage cetuximab-irinotecan. *Pharmacogenomics J.* 2010;10:458-64].
314. [Zhang W, Winder T, Ning Y, et al. A let-7 microRNA-binding site polymorphism in 3'-untranslated region of KRAS gene predicts response in wild-type KRAS patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab monotherapy. *Ann Oncol.* 2011;22(1):104-9].
315. [Boni V, Zarate R, Villa JC, et al. Role of primary miRNA polymorphic variants in metastatic colon cancer patients treated with 5-fluorouracil and irinotecan. *Pharmacogenomics J.* 2010; Epub ahead of print].
316. [R.W. Johnstone, Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer, *Nat. Rev. Drug Discov.* 1 (2002) 287–299.].

-
317. [Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. *Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. Nature.* 2004;429:457-463].
318. [Jones PA, Baylin SB. *The fundamental role of epigenetic events in cancer. Nat Rev Genet.* 2002;3:415-428].
319. [Baylin SB, Ohm JE. *Epigenetic gene silencing in cancer-a mechanism for early oncogenic pathway addiction? Nat Rev Cancer.* 2006;6:107-116]
320. [Jones PA, Laird PW. *Cancer epigenetics come of age. Nat Genet.* 1999;21:163-167].
321. [Jones PA, Takai D. *The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. Science.* 2001;293:1068-1070].
322. [Kaneda M, Okano M, Hata K, et al. *Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. Nature.* 2004; 429:900-903]
323. [Csankovszki G, Nagy A, Jaenisch R. *Synergism of Xist RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation. J Cell Biol.* 2001;153:773-784].
324. [Takai D, Jones PA. *The CpG Island searcher: a new WWW resource. In Silico Biol.* 2003;153:773-784]
325. [Takai D, Jones PA. *Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99:3740-3745].
326. [Gardiner-Garden M, Frommer M. *CpG island in vertebrate genomes. J Mol Biol.* 1987;196:261-282].
327. [Bird A. *DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev.* 2002;16:6-21].
328. [Klose RJ, Bird AP. *Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. Trends Biochem Sci.* 2006;31:89-97].
329. [Peters AH, Mermoud JE, O'Carroll D, et al. *Histone H3 lysine 9 methylation is an epigenetic imprint of facultative heterochromatin. Nat Genet.* 2002; 30:77-80]
330. [Herad E, Rougeulle C, Arnaud D, et al. *Methylation of histone H3 at Lys-9 is an early mark on the X chromosome during X inactivation. Cell.* 2001;107:727-738].
331. [Johnson L, Cao X, Jacobsen S. *Interplay between two epigenetic marks. DNA methylation and histone H3 lysine 9 methylation. Curr Biol.* 2002;12:1360-1367]
332. [Soppe WJ, Jasencakova Z, Houben A, et al. *DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in Arabidopsis. EMBO J.* 2002; 21:6549-6559].

333. [Tariq M, Saze H, Probst AV, Lichota J, et al. Erasure of CpG methylation in *Arabidopsis* alters patterns of histone H3 methylation in heterochromatin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:8823-8827]
334. [Nan X, Ng HH, Johnson CA, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*. 1998;393:386-389]
335. [Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP, et al. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem*. 2003;278:4035-4040].
336. [Fuks F, Burgers WA, Brehm A, et al. DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat Genet*. 2000;24:88-91].
337. [Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5:37-50]
338. [Chuang JC, Jones PA. Epigenetics and MicroRNAs. *Pediatr Res*. 2007;61(5):24R-29R].
339. [J.M. Thomson, M. Newman, J.S. Parker, E.M. Morin-Kensicki, T. Wright, S.M. Hammond. Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev*. 2006; 20: 2202–2207].
340. [T. Nakamura, E. Canaani, C.M. Croce. Oncogenic *All1* fusion proteins target Drosha-mediated microRNA processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2007; 104:10980–10985]
341. J.T. Mendell. miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. *Cell*. 2008; 133: 217–222.]
342. [N. Raver-Shapira, E. Marciano, E. Meiri, Y. Spector, N. Rosenfeld, N. Moskovits, Z. Bentwich, M. Oren. Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis, *Mol. Cell*. 2007; 26: 731–743].
343. [Zhou X, Ruan J, Wang G, Zhang W. Characterization and identification of microRNA core promotes in four model species. *PLoS Comput Biol*. 2007;3:e37].
344. [M. Toyota, H. Suzuki, Y. Sasaki, R. Maruyama, K. Imai, Y. Shinomura, T. Tokino. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res*. 2008; 68: 4123–4132].
345. [M.J. Bueno, I. Pérez de Castro, M. Gómez de Cedrón, J. Santos, G.A. Calin, J.C. Cigudosa, C.M. Croce, J. Fernández-Piqueras, M. Malumbres. Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances *ABL1* and *BCR-ABL1* oncogene expression. *Cancer Cell*. 2008;13: 496–506.].
346. [L. Vrbá, T.J. Jensen, J.C. Garbe, R.L. Heimark, A.E. Cress, S. Dickinson, M.R. Stampfer, B.W. Futscher. Role for DNA methylation in the regulation of miR-200c and miR-141 expression in normal and cancer cells. *PLoS One*. 2010; 5: e8697.]

347. [S.M. Park, A.B. Gaur, E. Lengyel, M.E. Peter. *The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2.* *Genes Dev.* 2008; 22: 894–907]
348. [P.A. Gregory, C.P. Bracken, A.G. Bert, G.J. Goodall. *MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition.* *Cell Cycle.* 2008;7: 3112–3118]
349. [P. Gandellini, M. Folini, N. Longoni, M. Pennati, M. Binda, M. Colecchia, R. Salvioni, R. Supino, R. Moretti, P. Limonta, R. Valdagni, M.G. Daidone, N. Zaffaroni. *MiR-205 Exerts tumor-suppressive functions in human prostate through down-regulation of protein kinase Cepsilon.* *Cancer Res.* 2009; 69: 2287–2295.].
350. [B. Brueckner, C. Stresemann, R. Kuner, C. Mund, T. Musch, M. Meister, H. Sültmann, F. Lyko, *The human let-7a-3 locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function,* *Cancer Res.* 2007; 67: 1419–1423.]
351. [L. Lu, D. Katsaros, I.A. de la Longrais, O. Sochirca, H. Yu, *Hypermethylation of let-7a-3 in epithelial ovarian cancer is associated with low insulin-like growth factor-II expression and favourable prognosis,* *Cancer Res.* 67 (2007) 10117–10122.].
352. [J. Datta, H. Kutay, M.W. Nasser, G.J. Nuovo, B. Wang, S. Majumder, C.G. Liu, S. Volinia, C.M. Croce, T.D. Schmittgen, K. Ghoshal, S.T. Jacob. *Methylation mediated silencing of MicroRNA-1 gene and its role in hepatocellular carcinogenesis.* *Cancer Res.* 2008; 68: 5049–5058.]
353. [K.H. Lee, C. Lotterman, C. Karikari, N. Omura, G. Feldmann, N. Habbe, M.G. Goggins, J.T. Mendell, A. Maitra. *Epigenetic silencing of MicroRNA miR-107 regulates cyclin-dependent kinase 6 expression in pancreatic cancer.* *Pancreatology.* 2009; 9: 293–301.].
354. [T. Ando, T. Yoshida, S. Enomoto, K. Asada, M. Tatematsu, M. Ichinose, T. Sugiyama, T. Ushijima. *DNA methylation of microRNA genes in gastric mucosae of gastric cancer patients: its possible involvement in the formation of epigenetic field defect.* *Int. J. Cancer.* 2009; 124: 2367–2374.]
355. [Y. Hashimoto, Y. Akiyama, T. Otsubo, S. Shimada, Y. Yuasa. *Involvement of epigenetically silenced microRNA-181c in gastric carcinogenesis,* *Carcinogenesis.* 2010: (Jan 15 Electronic publication ahead of print)].
356. [J. Roman-Gomez, X. Agirre, A. Jiménez-Velasco, V. Arqueros, A. Vilas-Zornoza, P. Rodríguez-Otero, I. Martín-Subero, L. Garate, L. Cordeu, E. San José-Eneriz, V. Martín, J.A. Castillejo, E. Bandrés, M.J. Calasanz, R. Siebert, A. Heiniger, A. Torres, F. Prosper, *Epigenetic regulation of microRNAs in acute lymphoblastic leukemia,* *J Clin. Oncol.* 2009; 27:1316–1322].

357. [X. Agirre, A. Vilas-Zornoza, A. Jiménez-Velasco, J.I. Martín-Subero, L. Cordeu, L. Gárate, E. San José-Eneriz, G. Abizanda, P. Rodríguez-Otero, P. Fortes, J. Rifón, E. Bandrés, M.J. Calasanz, V. Martín, A. Heiniger, A. Torres, R. Siebert, J. Román- Gomez, F. Prósper, *Epigenetic silencing of the tumor suppressor microRNA HsamiR- 124a regulates CDK6 expression and confers a poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia*, *Cancer Res.* 2009; 69: 4443–4453].
358. [Y. Saito, H. Suzuki, H. Tsugawa, I. Nakagawa, J. Matsuzaki, Y. Kanai, T. Hibi, *Chromatin remodeling at Alu repeats by epigenetic treatment activates silenced microRNA-512-5p with downregulation of Mcl-1 in human gastric cancer cells*, *Oncogene.* 2009; 28; 2738–2744.]
359. .[S.P. O'Hara, P.L. Splinter, G.B. Gajdos, C.E. Trussoni, M.E. Fernandez-Zapico, X.M. Chen, N.F. LaRusso, *NFkappaB p50-CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta)-mediated transcriptional repression of microRNA let-7i following microbial infection*, *J. Biol. Chem.* 2010; 285:216–225]
360. [Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC. *The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila.* *Cell* 2007; 130: 89-100.]
361. [Y. Saito, J.M. Friedman, Y. Chihara, G. Egger, J.C. Chuang, G. Liang. *Epigenetic therapy upregulates the tumor suppressor microRNA-126 and its host gene EGFL7 in human cancer cells.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009; 379: 726–731.].
362. [Yates DR, Rehman I, Meuth M, Cross SS, Hamdy FC, Catto JW. *Methylational urinalysis: a prospective study of bladder cancer patients and age stratified benign controls.* *Oncogene* 2006; 25: 1984-8.]
363. [Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, Cui H, Gabo K, Rongione M, Webster M, Ji H, Potash JB, Sabunciyan S, Feinberg AP. *The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissuespecific CpG island shores.* *Nat Genetics* 2009; 41: 178-86.]
364. [M. Fabbri, R. Garzon, A. Cimmino, Z. Liu, N. Zanesi, E. Callegari, S. Liu, H. Alder, S. Costinean, C. Fernandez-Cymering, S. Volinia, G. Guler, C.D. Morrison, K.K. Chan, G. Marcucci, G.A. Calin, K. Huebner, C.M. Croce. *MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases3A and 3B.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007; 104: 15805–15810.]
365. [R. Garzon, S. Liu, M. Fabbri, Z. Liu, C.E. Heaphy, E. Callegari, S. Schwind, J. Pang, J. Yu, N.Muthusamy, V. Havelange, S. Volinia, W. Blum, L.J. Rush, D. Perrotti, M. Andreeff, C.D. Bloomfield, J.C. Byrd, K. Chan, L.C. Wu, C.M. Croce, G. Marcucci. *MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute*

- myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1. Blood.*2009; 113: 6411–6418.].
366. [A.M. Duursma, M. Kedde, M. Schrier, C. le Sage, R. Agami. *miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. RNA* .2008; 14: 872–877.]
367. [C. Braconi, N. Huang, T. Patel. *MicroRNA-dependent regulation of DNA methyltransferase-1 and tumor suppressor gene expression by interleukin-6 in human malignant cholangiocytes. Hepatology.* 2009.]
368. [A. Strillacci, C. Griffoni, P. Sansone, P. Paterini, G. Piazzzi, G. Lazzarini, E. Spisni, M.A. Pantaleo, G. Biasco, V. Tomasi. *MiR-101 downregulation is involved in cyclooxygenase-2 overexpression in human colon cancer cells. Exp. Cell Res.* 2009; 315: 1439–1447.]
369. [H. Su, J.R. Yang, T. Xu, J. Huang, L. Xu, Y. Yuan, S.M. Zhuang. *MicroRNA-101, downregulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity. Cancer Res.* 2009; 69: 1135–1142.]
370. [J.M. Friedman, G. Liang, C.C. Liu, E.M. Wolff, Y.C. Tsai, W. Ye, X. Zhou, P.A. Jones. *The putative tumor suppressor microRNA-101 modulates the cancer epigenome by repressing the polycomb group protein EZH2. Cancer Res.* 2009; 69: 2623–2629.]
371. [S. Varambally, Q. Cao, R.S. Mani, S. Shankar, X. Wang, B. Ateeq, B. Laxman, X. Cao, X. Jing, K. Ramnarayanan, J.C. Brenner, J. Yu, J.H. Kim, B. Han, P. Tan, C. Kumar- Sinha, R.J. Lonigro, N. Palanisamy, C.A. Maher, A.M. Chinnaiyan. *Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. Science* .2008; 322: 1695–1699.]
372. [B. Song, Y. Wang, Y. Xi, K. Kudo, S. Bruheim, G.I. Botchkina, E. Gavin, Y. Wan, A. Formentini, M. Kornmann, O. Fodstad, J. Ju. *Mechanism of chemoresistance mediated by miR-140 in human osteosarcoma and colon cancer cells. Oncogene* .2009; 28: 4065–4074.]
373. [J.F. Chen, E.M. Mandel, J.M. Thomson, Q. Wu, T.E. Callis, S.M. Hammond, F.L.Conlon, D.Z. Wang. *The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. Nat Genet.* 2006; 228–233.]
374. [L. Tuddenham, G. Wheeler, S. Ntounia-Fousara, J. Waters, M.K. Hajihosseini, I. Clark, T. Dalmy. *The cartilage specific microRNA-140 targets histone deacetylase 4 in mouse cells. FEBS Lett.* 2006; 580: 4214–4217.]
375. [E.J. Noonan, R.F. Place, D. Pookot, S. Basak, J.M. Whitson, H. Hirata, C. Giardina, R. Dahiya. *miR-449a targets HDAC-1 and induces growth arrest in prostate cancer. Oncogene.* 2009; 28: 1714–1724.]

376. [Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, Maruyama R, et. Al. Epigenetic Silencing of MicroRNA-34b/c and B-Cell Translocation Gene 4 Is Associaed with CpG Island Methylation in Colorectall Cancer. *Cancer Res.* 2008;68(11):4123-4132]
377. [Corney DC, Hwang CII, Matoso A, et al. Frequent Downregulation of miR-34 Family in Human Ovarian Cancers. *Clin Cancer Res.* 2010; 16(4):1119-1128].
378. [Corney DC, Flesken-Nikitin A, Godwin AK, Wang W, Nikitin AY. MicroRNA-34b and MicroRNA-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion-independent growth. *Cancer Res* 2007;67:8433–8.]
- 379.[Tarasov V, Jung P, Verdoodt B, et al. Differential regulation of micro- RNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle* 2007;6:1586–93.]
380. [Bommer GT, Gerin I, Feng Y, et al. p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Curr Biol* 2007;17: 1298–307.]
381. [Hermeking H. The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ* 2010;17:193–9.]
382. [Lodygin D, Tarasov V, Epanchintsev A, Berking C, Knyazeva T and Korner H et al. Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle* 2008; 7: 2591–2600].
383. [Collado M, Blasco MA and Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 2007; 130: 223–233.].
384. [Leucci E, Cocco M, Onnis A, De Falco G, van Cleef P and Bellan C et al. MYC translocation-negative classical Burkitt lymphoma cases: an alternative pathogenetic mechanism involving miRNA deregulation. *J Pathol* 2008; 216: 440–450.]
385. [Kong YW, Cannell IG, de Moor CH, Hill K, Garside PG and Hamilton TL et al. The mechanism of micro-RNA-mediated translation repression is determined by the promoter of the target gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 8866–8871.]
386. [Leung AK and Sharp PA. microRNAs: a safeguard against turmoil? *Cell* 2007; 130: 581–585.].
387. [Cohen SM, Brennecke J and Stark A. Denoising feedback loops by thresholding—a new role for microRNAs. *Genes Dev* 2006; 20: 2769–2772.].
388. [Ji Q, Hao X, Zhang M, et al. MicroRNA mir-34 Inhibits Human Pancreatic Cancer Tumor-Initiating Cells. *PLoS ONE*.2009;4(8)e6816]
389. [O'Day E, Lal A. MicroRNAs and their target gene networks iin breast cancer. *Breast Cancer research.* 2010;12:201]

390. [Welch C, Chen Y, Stalling RL. *MicroRNA 34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. Oncogene. 2007; 26:5017-22.*
391. [Gallardo E, Navarro A, Vinolas N, et al. *miR-34a as a prognostic marker of relapse in surgically resectate non-small-cell lung cancer. Carcinogenesis. 2009;30(11):1903-1909.*
392. [Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, et al. *Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. Mol Cell. 2007;26:745-52]*
393. [Zenz T, Mohr J, Eldering E, Kater AP, Buhler A and Kienle D et al. *MiR-34a as part of the chemotherapy resistance network in chronic lymphocytic leukemia. Blood 2009; 113: 3801–3808.*]
394. [Mraz M, Malinova K, Kotaskova J, Pavlova S, Tichy B and Malcikova J et al. *miR-34a, miR- 29c and miR-17-5p are downregulated in CLL patients with TP53 abnormalities. Leukemia 2009; [E-pub ahead of print]. doi: 10.1038.*]
395. [Kumamoto K, Spillare EA, Fujita K, Horikawa I, Yamashita T and Appella E et al. *Nutlin-3a activates p53 to both down-regulate inhibitor of growth 2 and up-regulate mir-34a, mir-34b, and mir-34c expression, and induce senescence. Cancer Res 2008; 68: 3193–3203.*]
396. [Cannell IG, Kong YW, Johnston SJ, Chen ML, Collins HM, Dobbyn HC, et al. *p38 MAPK/MK2- mediated induction of miR-34c following DNA damage prevents Myc-dependent DNA replication. Proc Natl Acad Sci USA 2010; 107:5375-80.*]
397. [Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Issaeva N, et al. *Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. Nature 2006; 444:633-7.]*
398. [Cannell IG, Bushell M. *Regulation of Myc by miR-34c A mechanism to prevent genomic instability? Cell Cycle. 2010; 9(14): 2726-2730.*]
399. [Morton JP, Timpson P, Karim SA, Ridgway RA, Athineos D, Doyle B, et al. *Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/senescence in pancreatic cancer. Proc Natl Acad Sci USA 2010; 107:246-51.]*
400. [Blagosklonny MV. *p53 from complexity to simplicity: mutant p53 stabilization, gain-of-function and dominant-negative effect. FASEB J 2000; 14:1901-7]*
401. [Muller PA, Caswell PT, Doyle B, Iwanicki MP, Tan EH, Karim S, et al. *Mutant p53 drives invasion by promoting integrin recycling. Cell 2009; 139:1327-41.*]
402. [Zhang XY, DeSalle LM, Patel JH, Capobianco AJ, Yu D, Thomas-Tikhonenko A, et al. *Metastasis-associated protein 1 (MTA1) is an essential downstream effector of the c-MYC oncoprotein. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102:13968-73]*

403. [Ma L, Young J, Prabhala H, Pan E, Mestdagh P, Muth D, et al. *miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. Nat Cell Biol* 2010; 12:247-56.]
404. [Yamakuchi M, Ferlito M, and Lowenstein CJ. *miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105:13421-6].
405. [Wang BD, Kline CL, Pastor DM, et al. *Prostate apoptosis response protein 4 sensitizes human colon cancer cells to chemotherapeutic 5-FU through mediation of NF- κ B and microRNA network. Mol Cancer.* 2010; 9:98].
406. [Paris R, Henry RE, Stephens SJ, et al. *Multiple p53-independent gene silencing mechanisms define the cellular response to p53 activation. Cell Cycle.* 2008; 7:2427-33].
407. [Bandres E, Agirre X, Bitarte N. *Epigenetic regulation of microRNA expression in colorectal cancer. Int J Cancer.* 2009; 117:1-7].
408. [Zhong X, Li N, Liang S, et al. *Identification of microRNAs regulating reprogramming factor LIN28 in embryonic stem cells and cancer cells. JBC.* 2010; 1-25].
409. [Ambros, V., and Horvitz, H. R. (1984) *Science* 226, 409-416]
410. [Moss, E. G., Lee, R. C., and Ambros, V. (1997) *Cell* 88, 637-646]
411. [Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, II, and Thomson, J. A. (2007) *Science* 318, 1917-1920].
412. [Polesskaya, A., Cuvellier, S., Naguibneva, I., Duquet, A., Moss, E. G., and Harel-Bellan, A.(2007) *Genes Dev* 21, 1125-1138]
413. [West, J. A., Viswanathan, S. R., Yabuuchi, A., Cunniff, K., Takeuchi, A., Park, I. H., Sero, J. E., Zhu, H., Perez-Atayde, A., Frazier, A. L., Surani, M. A., and Daley, G. Q. (2009) *Nature* 460, 909-913]
414. [Balzer, E., Heine, C., Jiang, Q., Lee, V. M., and Moss, E. G. (2010) *Development* 137, 891-900]
415. [Zhu, H., Shah, S., Shyh-Chang, N., Shinoda, G., Einhorn, W. S., Viswanathan, S. R., Takeuchi, A., Grasemann, C., Rinn, J. L., Lopez, M. F., Hirschhorn, J. N., Palmert, M. R., and Daley, G. Q. (2010) *Nat Genet*]
416. [Viswanathan, S. R., and Daley, G. Q. (2010) *Cell* 140, 445-449]
417. [Moss, E. G., and Tang, L. (2003) *Dev Biol* 258, 432-442]
418. [Yang, D. H., and Moss, E. G. (2003) *Gene Expr Patterns* 3, 719-726]
419. [Viswanathan, S. R., Powers, J. T., Einhorn, W., Hoshida, Y., Ng, T. L., Toffanin, S., O'Sullivan, M., Lu, J., Phillips, L. A., Lockhart, V. L., Shah, S. P., Tanwar, P. S., Mermel, C. H., Beroukhi, R., Azam, M., Teixeira, J., Meyerson, M., Hughes, T. P., Llovet, J. M.,

- Radich, J., Mullighan, C. G., Golub, T. R., Sorensen, P. H., and Daley, G. Q. (2009) *Nat Genet* 41, 843-848]
420. [Chang, T. C., Zeitels, L. R., Hwang, H. W., Chivukula, R. R., Wentzel, E. A., Dews, M., Jung, J., Gao, P., Dang, C. V., Beer, M. A., Thomas-Tikhonenko, A., and Mendell, J. T. (2009) *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3384-3389]
421. [Iliopoulos, D., Hirsch, H. A., and Struhl, K. (2009) *Cell* 139, 693-706]
422. [Dangi-Garimella, S., Yun, J., Eves, E. M., Newman, M., Erkeland, S. J., Hammond, S. M., Minn, A. J., and Rosner, M. R. (2009) *EMBO J* 28, 347-358]
423. [Peng, S., Maihle, N. J., and Huang, Y. (2010) *Oncogene* 29, 2153-2159]
424. [Guo, Y., Chen, Y., Ito, H., Watanabe, A., Ge, X., Kodama, T., and Aburatani, H. (2006) *Gene* 384, 51-61]
425. [Lu, L., Katsaros, D., Shaverdashvili, K., Qian, B., Wu, Y., de la Longrais, I. A., Preti, M., Menato, G., and Yu, H. (2009) *Eur J Cancer* 45, 2212-2218]
426. [Wang, Y. C., Chen, Y. L., Yuan, R. H., Pan, H. W., Yang, W. C., Hsu, H. C., and Jeng, Y. M. *Carcinogenesis*].
427. [Onnis A, De Falco G, Antonicelli G. Alteration of MicroRNAs Regulated by c-Myc in Burkitt Lymphoma. *PLoS one*.2010;5(9):e12960].
428. [Gumbiner, B. M. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 622–634 (2005).].
429. [Hu X, Schwarz J, Lewis JS, et al. A microRNA Expression Signature for Cervical Cancer Prognosis. *Cancer Res.* 2010;70(4):1441-1448].
430. [Wan HY, Guo LM, Liu T, et al. Regulation of the transcription factor NF- κ B1 by microRNA-9 in human gastric adenocarcinoma. *Molecular Cancer.* 2010;; 9:16].
431. [Myatt SS, Wang J, Monteiro LJ, et al. Definition of microRNAs That Repress Expression of the Tumor Suppressor Gene FOXO in Endometrial Cancer. *Cancer Res.* 2010; 70(1):367-377].
432. [Dudziec E, Miah S, Choudhry HMZ, et al. Hypermethylation of CpG Island and Shores around specific MicroRNAs and Mirtrons is associated with the phenotype and presence of Bladder Cancer. *Cancer Res.* 2010; in press].
433. [Trankenschuh W, Puls F, Christgen M, et al. Frequent and Distinct Aberrations of DNA Methylation Patterns in Fibrolamellar Carcinoma of the Liver. *PLoS one.* 2010;5(10):e13688].
434. [Trinh BN, Long TI, Laird PW. DNA methylation analysis by Methylight technology. *Methods.* 2001; 25: 456-62].

435. [Chhibber A., Schroeder B.G.. *Single-molecule polymerase chain reaction reduces bias: Application to DNA methylation analysis by bisulfite sequencing. Analytical Biochemistry* 377 (2008) 46-54.]
436. .[Brena R.M., Huang T.H.M., Plass C.. *Quantitative assessment of DNA methylation: potential applications for disease diagnosis, classification, and prognosis in clinical setting. J Mol Med* 84 (2006) 365-377.]
437. [Taylor K.H., Kramer R.S., Davis J.W. et al. *Ultradeep bisulfite sequencing analysis of DNA methylation patterns in multiple gene promoters by sequencing. Cancer Reserch* 67 (2007) 8511-8518.]
438. [Ehrich M., Zoll S., Sur S., van den Boom D. *A new method for accurate assessment of DNA quality after bisulfite treatment. Nucleic Acids Reserch* 35 (2007) e29.]

RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare in particolar modo il Prof. Pazzagli e il Prof. Orlando per le opportunità che mi sono state date in questi anni. In particolare sono davvero grata al Prof. Orlando per aver creduto in me ed avermi insegnato così tante cose. I sei anni trascorsi nel Laboratorio di Biochimica Clinica hanno rappresentato un'esperienza di crescita professionale unica.

Un ringraziamento speciale va ai miei colleghi, alla Dr.ssa Pamala Pinzani, alla Dr.ssa Lisa Simi, alla Dr.ssa Francesca Malentacchi, alla Dr.ssa Francesca Salvianti e al Dr Nicola Pratesi per tutto ciò che sono riusciti ad insegnarmi e per tutti i momenti che abbiamo condiviso insieme.

In particolar modo vorrei ringraziare la Dr.ssa Stefania Gelmini per il contributo che ha dato nella realizzazione di questi studi e per l'opera di revisione che ha fatto, ma soprattutto perché mi ha permesso di crescere professionalmente, facendomi superare tanti limiti che senza di lei non sarei mai riuscita a superare.

Un ringraziamento speciale va alla Dr.ssa Irene Mancini, per l'amicizia, la sincerità, la schiettezza e l'aiuto datomi in tutti i momenti difficili.

Vorrei ringraziare anche gli ex-tirocinanti, che hanno contribuito con il loro prezioso aiuto a questi progetti, come la Dr.ssa Simona Conti, Dr.ssa Arianna Ferrini, Dr.ssa Cristina Beltrami e la Dr.ssa Giulia Forni.

Infine vorrei ringraziare la mia famiglia, ma soprattutto mio padre e David, che mi hanno sopportata e consigliata in tutto questo meraviglioso percorso, è anche grazie a voi se sono arrivata fin qui.

Un GRAZIE DI CUORE a tutti!