

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA FUNZIONALE DEI SISTEMI CELLULARI E
MOLECOLARI**

Ciclo XXII

Settore scientifico disciplinare di afferenza: BIO/11

**STUDIO DEI PROFILI DI ESPRESSIONE DEI MICRORNA
NELL'EPATOCARCINOMA UMANO**

Presentata da: Dr.ssa Francesca Fornari

Coordinatore Dottorato

Prof. Vincenzo Scarlato

Relatore

Prof. Giovanni Capranico

Correlatore

Prof. Luigi Bolondi

Esame finale anno 2009

INDICE

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE	7
1.1 Il carcinoma epatocellulare	8
1.1.1 Classificazione molecolare del carcinoma epatocellulare	13
1.2 I microRNA	17
1.2.1 Biogenesi e ruolo biologico dei microRNA.....	19
1.2.2 MicroRNA e cancro	23
1.2.3 MicroRNA ed epatocarcinoma	27
1.2.4 MicroRNA e clinica: diagnosi, prognosi e nuovi trattamenti	32
1.3 SCOPO DELLA RICERCA DI TESI	37
CAPITOLO 2: MATERIALI E METODI	38
2.1 Raccolta di campioni di pazienti con epatocarcinoma	39
2.2 Microarray di microRNA	39
2.3 Northern blot	41
2.4 Colture cellulari	46
2.5 Trasfezione cellulare	48
2.6 Preparazione di estratti proteici da linee cellulari e tessuti	50
2.7 Dosaggio di estratti proteici tramite Lowry assay (Kit Biorad)	51

2.8	Western blot	52
2.9	Estrazione di RNA da linee cellulari e tessuti	55
2.10	Real time PCR.....	56
2.11	Trascrizione inversa.....	59
2.12	PCR semi-quantitativa	61
2.13	Clonaggi	63
2.14	Saggio di luciferasi	73
2.15	Citofluorimetria a flusso.....	74
2.16	Saggio di invasione cellulare	76
	 CAPITOLO 3: RISULTATI.....	 78
3.1	Individuazione di un pannello di microRNA deregolati nell'epatocarcinoma umano tramite analisi di microarray	79
3.1.1	Validazione dell'analisi di microarray tramite Northern blot.....	83
3.1.2	Validazione dell'analisi di microarray tramite Real time PCR	85
3.2	Studio del ruolo biologico del microRNA-122: regolazione della ciclina G1 in linee cellulari di epatocarcinoma	86
3.2.1	Il microRNA-122 regola l'espressione e la stabilità di p53 attraverso la modulazione di ciclina G1	92

3.2.2	Il microRNA-122 e la ciclina G1 regolano il ciclo cellulare e l'invasione della linea cellulare HepG2.....	98
3.2.3	Il microRNA-122 e la ciclina G1 sensibilizzano la linea cellulare HepG2 al trattamento con Doxorubicina.....	101
3.2.4	Il microRNA-122 e la ciclina G1 correlano con variabili clinico-patologiche di pazienti con epatocarcinoma.....	103
3.3	Studio del ruolo biologico del microRNA-221: regolazione di CDKN1C/p57 e CDKN1B/p27 in linee cellulari di epatocarcinoma	107
3.3.1	Il microRNA-221 regola il ciclo cellulare e la crescita in linee cellulari di epatocarcinoma	113
3.3.2	Correlazione inversa tra il microRNA-221 e i due target molecolari in pazienti con epatocarcinoma.....	115
3.3.3	Il microRNA-221 regola l'espressione di Bmf in linee cellulari di epatocarcinoma	118
3.3.4	Il microRNA-221 è sovra-espresso in condizioni di non-adesione alla matrice extra-cellulare e induce apoptosi tramite l'inibizione di Bmf ...	122
3.3.5	Ruolo prognostico del microRNA-221: correlazione con la focalità del tumore ed il tempo di insorgenza di recidiva epatica in pazienti chirurgicamente trattati per epatocarcinoma.....	126
3.4	Studio del ruolo biologico del microRNA-199a-3p: regolazione dei pathway molecolari di mTOR e c-Met in linee cellulari di epatocarcinoma	132

3.4.1	Il microRNA-199a-3p ed i suoi bersagli molecolari regolano il ciclo cellulare in linee cellulari di epatocarcinoma	137
3.4.2	Il microRNA-199a-3p regola la sensibilità alla Doxorubicina, l'apoptosi in condizioni ipossiche e le capacità invasive in linee cellulari di epatocarcinoma	141
3.4.3	Ruolo prognostico del microRNA-199a-3p: correlazione con il tempo di insorgenza di recidiva epatica in pazienti chirurgicamente trattati per epatocarcinoma	144

CAPITOLO 4148

4.1	L'identificazione di un pannello di microRNA rappresenta un passaggio fondamentale per l'individuazione di nuovi bersagli terapeutici per il trattamento non-convenzionale di pazienti con epatocarcinoma in stadio intermedio-avanzato	149
4.2	La regolazione del pathway ciclina G1/p53 da parte del microRNA-122 rappresenta un possibile meccanismo molecolare implicato nel processo di epatocarcinogenesi, in grado di sensibilizzare le cellule di epatocarcinoma al trattamento con Doxorubicina	151
4.3	La regolazione di importanti processi cellulari da parte del microRNA-221 pone le basi per lo sviluppo di un possibile approccio terapeutico con molecole antagoniste dei microRNA per il trattamento non-convenzionale di pazienti con epatocarcinoma in stadio intermedio-avanzato	154

4.4	La regolazione dei pathway molecolari di mTOR e c-Met da parte del microRNA-199a-3p rappresenta un possibile meccanismo molecolare implicato nel processo di epatocarcinogenesi, in grado di sensibilizzare le cellule di epatocarcinoma al trattamento con Doxorubicina	155
4.5	Prospettive future.....	157
	BIBLIOGRAFIA.....	160

CAPITOLO 1
INTRODUZIONE

1.1 Il carcinoma epatocellulare

Il carcinoma epatocellulare (HCC) è il più frequente tumore maligno del fegato e rappresenta il sesto tipo di tumore più comune nel mondo. Inoltre, essendo i pazienti diagnosticati a stadi piuttosto avanzati, l'epatocarcinoma rappresenta la terza causa di mortalità associata a tumore, con un'incidenza in aumento (1, 2). Nei paesi occidentali, l'insorgenza di epatocarcinoma è strettamente correlata con la presenza di cirrosi epatica e circa l'80% dei tumori insorgono su di fegato affetto da cirrosi o da epatite cronica (3).

L'epatocarcinoma è un tumore che presenta un'etiologia molto eterogenea: l'HCC risulta infatti associato a differenti fattori di rischio molto ben caratterizzati. I principali fattori di rischio includono il virus dell'epatite B (HBV), il virus dell'epatite C (HCV), l'assunzione cronica di alcol, l'esposizione alimentare prolungata all'aflatossina B1 (AFB1) e l'emocromatosi primaria. Nel 90% dei casi di HCC, almeno uno di questi fattori di rischio può essere identificato, da solo o in combinazione con altri, e l'associazione con i differenti fattore di rischio varia a seconda dell'origine geografica del paziente (4).

Lo sviluppo di HCC in un fegato con una patologia cronica è un processo multistep, noto come epatocarcinogenesi, caratterizzato dall'accumulo progressivo di alterazioni genetiche che possono causare crescita cellulare aberrante, trasformazione maligna del parenchima cellulare epatico, e successivamente invasione vascolare e metastasi (**Figura 1**). Infezioni da HBV e HCV ed esposizione cronica ad alcol sono tra i più comuni epatocarcinogeni nell'uomo; la loro presenza è causa di danno al DNA degli epatociti, alterato riparo dovuto a necro-infiammazione cronica ed infine rigenerazione tissutale

intensiva e fibrogenesi. L'insorgenza di epatocarcinoma è spesso preceduta da lesioni preneoplastiche, le quali includono foci e noduli displastici. I foci displastici si suddividono in piccoli foci (SCD) caratterizzati da epatociti con un diminuito volume citoplasmatico, polimorfismo nucleare ed aumentato rapporto nucleo/citoplasma, e grandi foci (LSD) caratterizzati da aumentate dimensioni cellulari e nucleari, polimorfismo nucleare con nucleoli prominenti e normale rapporto nucleo/citoplasma. I foci SCD hanno un elevato indice proliferativo con caratteristiche morfologiche e istologiche simili all'HCC e di frequente danno origine a noduli displastici (DN), i quali vengono considerati come lesioni che precedono l'epatocarcinoma a causa della loro frequente associazione con la sua insorgenza (5). Al contrario, i foci LCD non presentano caratteristiche comuni all'HCC ed è controverso se si possano considerare come lesioni preneoplastiche; sembrano piuttosto derivare da epatociti senescenti con un'alterata proliferazione cellulare dovuta alla presenza di infiammazione e rigenerazione cronica (6).

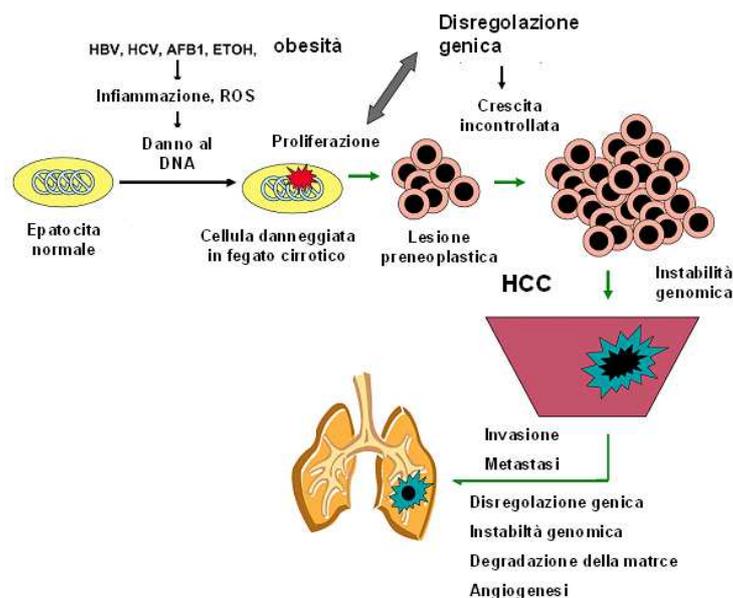


Figura 1. Meccanismo di epatocarcinogenesi. (Figura da: Teoh, NC. JGH. 2009. 24:1817-25).

Poiché la cirrosi è considerata una lesione epatica preneoplastica, i pazienti cirrotici vengono inseriti in standardizzati programmi di screening per l'individuazione precoce di HCC; tali programmi prevedono controlli periodici (ogni 6 mesi) attraverso esami ecografici e determinazione dei livelli sierici di alfa-fetoproteina (AFP), un marcatore circolante di HCC (7). Gli esami ecografici hanno un ruolo chiave nella diagnosi dell'HCC, e sempre più spesso questo tumore viene diagnosticato quando è ancora asintomatico, in pazienti portatori di cirrosi epatica e soggetti a controlli frequenti (8). L'uso della tomografia computerizzata e apparecchiature per la risonanza magnetica sempre più sofisticate hanno portato ad una maggiore sensibilità e specificità delle tecniche diagnostiche dell'HCC. La diagnosi precoce rimane un punto chiave per migliorare la prognosi di questo tumore. Identificare la patologia quando sono presenti tumori ancora piccoli e asintomatici comporta infatti migliori possibilità di trattamento. Determinare accuratamente lo stadio dell'HCC è importante per formulare la prognosi e per decidere la terapia migliore. Fattori importanti da considerare per il trattamento del tumore sono la grandezza, la multifocalità, la gravità di altre patologie epatiche sottostanti e lo stato di salute generale del paziente.

In base allo stadio al quale vengono diagnosticati, gli epatocarcinomi vengono suddivisi in tre grandi categorie: HCC precoci, HCC intermedi-avanzati e HCC tardivi. Da un punto di vista clinico, lo stadio del tumore considerato precoce è caratterizzato dalla presenza di un'unica massa inferiore ai 5 cm di diametro, oppure 3 noduli minori di 3 cm di diametro e dalla assenza di invasione vascolare e di metastatizzazione. Questi sono i requisiti necessari per poter ricevere trattamenti curativi con discrete possibilità di successo. I trattamenti curativi per

l'HCC comprendono la resezione chirurgica, l'ablazione percutanea ed il trapianto di fegato. Perché sia possibile una resezione chirurgica il paziente deve avere una buona funzionalità epatica; in caso questa condizione non sia soddisfatta, il miglior trattamento per gli HCC precoci non resecabili è l'ablazione percutanea con la quale si ottiene la necrosi del tumore tramite l'iniezione di agenti chimici, come l'alcol o l'acido acetico, o mediante l'uso di mezzi fisici come la radiofrequenza. Il trapianto è indicato quando le funzioni epatiche sono danneggiate, ed il tumore non ha raggiunto i vasi sanguigni con probabilità di aver dato metastasi extraepatiche. Teoricamente il trapianto è il miglior trattamento per l'HCC poiché permette la rimozione, non solo del tratto epatico invaso, ma anche del tessuto circostante che è a rischio di sviluppare un altro cancro. Purtroppo il numero di trapianti possibili è limitato dall'alta frequenza degli HCC e dalla mancanza di un sufficiente numero di donatori, il che allunga notevolmente i tempi di attesa. Durante questi ritardi, la progressione del tumore spesso fa sì che si esca dai parametri richiesti per il trattamento rendendo il paziente non più idoneo per il trapianto. Inoltre, nonostante i trattamenti curativi offrano una probabilità di sopravvivenza a 5 anni del 50-70% (9), l'insorgenza di recidiva epatica supera il 70% entro i 5 anni ed è causata da tumori meta-cronici che insorgono su fegato cirrotico oppure, nel 10-15% dei casi, a siti di disseminazione del tumore non diagnosticati dagli studi di imaging pre-operatorio (10).

In caso di HCC in stadio intermedio (tumore multi-nodulare con assenza di invasione vascolare) la chemioembolizzazione (TACE) della massa neoplastica è risultato da studi clinici un trattamento in grado di espandere il tempo di sopravvivenza medio dei pazienti (da 16 a 20 mesi), ed è considerato lo standard di cura (11). L'ostruzione dell'arteria che nutre la zona del fegato sede della

massa tumorale, ottenuta con l'iniezione di agenti come la gelatina, arresta il flusso ematico nei capillari del tumore, portandolo a necrosi. L'associazione a questi agenti con chemioterapici, quali la doxorubicina, aumenta l'azione antitumorale.

In caso di HCC in stadio avanzato (con tumore sintomatico, o invasione vascolare o diffusione extra-epatica), l'unico trattamento in grado di incrementare la sopravvivenza media dei pazienti (da 7.9 a 10.7 mesi) è il trattamento con Sorafenib (12), un multi-inibitore di tirosina cinasi, approvato nel 2006 dalla Food and Drug Administration (FDA) come trattamento di prima linea per HCC in stadio avanzato. Questo composto inibisce la proliferazione delle cellule neoplastiche e l'angiogenesi tumorale in un ampio spettro di tumori. Agisce inibendo le cinasi Raf1 e B-Raf, le cinasi dei recettori 1, 2, 3 del fattore di accrescimento endoteliale (VEGF) e la cinasi del recettore del fattore di crescita di origine piastrinica (PDGF). Attraverso l'inibizione di vie molecolari che giocano un ruolo importante nella patogenesi dell'epatocarcinoma, il Sorafenib è probabilmente in grado di ritardare la progressione tumorale portando ad un beneficio in termini di sopravvivenza. Oltre al Sorafenib, il trattamento dell'HCC con convenzionali agenti chemioterapici è poco efficace e causa pesanti effetti tossici collaterali dovuti alla funzionalità epatica compromessa a causa della sottostante patologia epatica.

La prognosi di HCC tardivi è molto infausta (3-4 mesi) ed al momento attuale non esistono trattamenti efficaci, ma solo cure palliative (**Figura 2**).

A fronte della scarsa efficacia della chemioterapia sistemica degli HCC con i farmaci attualmente a disposizione e dell'alta incidenza di recidiva epatica in pazienti curativamente trattati per epatocarcinoma, si evidenzia l'urgenza di

individuare nuovi bersagli molecolari e di sviluppare nuovi trattamenti per l'epatocarcinoma umano.

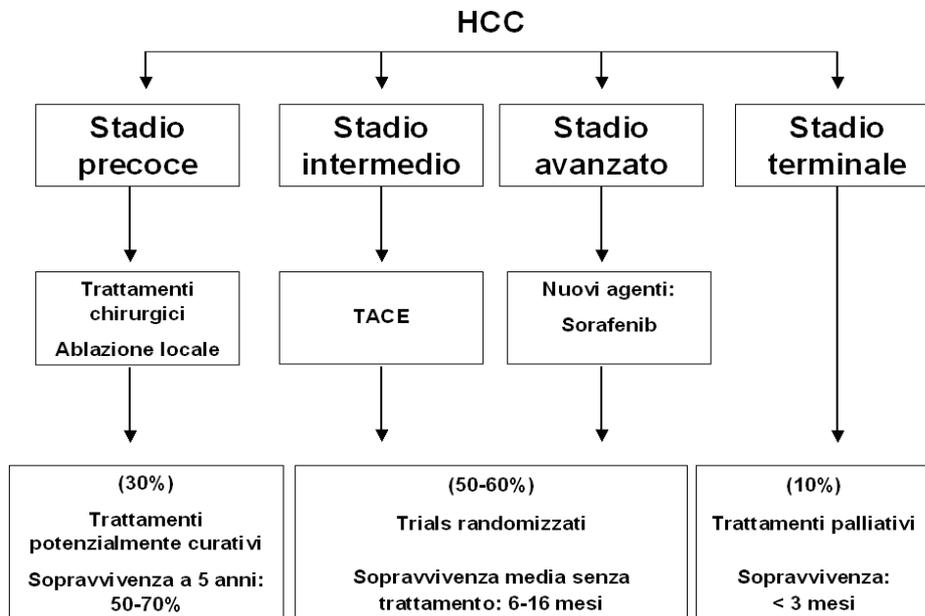


Figura 2. Trattamenti di epatocarcinomi in differenti stadi di progressione. Per ogni stadio è indicato lo standard di cura stabilito dalle linee guida.

1.1.1 Classificazione molecolare del carcinoma epatocellulare

Lo sviluppo di epatocarcinoma in un fegato affetto da una patologia cronica è un processo multifattoriale caratterizzato dall'accumulo progressivo di alterazioni genetiche ed instabilità cromosomica. Nell'ultima decade numerosi studi sono stati pubblicati nel tentativo di identificare firme molecolari di espressione genica nell'epatocarcinoma. Tali studi risultano però altamente eterogenei dal punto di vista dell'individuazione di un profilo comune di alterazioni genetiche, rendendo difficile la definizione di una firma molecolare 'signature' di questo tumore. Analizzando contemporaneamente questi studi di profiling, l'elemento più significativo che emerge è la frequente sovraespressione di geni coinvolti nella

proliferazione cellulare e nella promozione della mitosi; gli HCC individuati da tale *signature* vengono definiti come ‘*gruppo proliferativo*’ e sono caratterizzati da una prognosi più infausta. In tale raggruppamento spiccano inoltre una serie di consistenti riarrangiamenti genetici, associati ad una diminuita sopravvivenza del paziente indipendentemente dall’eziologia del tumore. Alla luce di queste osservazioni sembra ragionevole dedurre che elementi quali aumentata proliferazione degli epatociti, incrementato indice mitotico e disregolazione di geni modulatori del ciclo cellulare siano sinergicamente coinvolti nel processo di epatocarcinogenesi (6).

Lo studio di Laurent-Puig e Zucman-Rossi (13) suddivide in due gruppi principali le alterazioni genetiche identificate in tessuti di HCC. Il primo gruppo di alterazioni è specifico dei fattori di rischio associati al tumore, quali integrazione genomica del virus dell’epatite B, mutazioni nel gene oncosoppressore p53 successive all’esposizione prolungata all’aflatossina, mutazioni nell’oncogene KRAS dovute all’esposizione al cloruro di vinile, e mutazioni della linea germinale predisponenti all’epatoblastoma. Il secondo set di alterazioni genetiche è indipendente dall’eziologia dell’HCC ed include acquisizione o perdita cromosomica, alterazioni di p53, attivazione della via di WNT/ β -catenina, attivazione dei geni RB1, p16 ed IGFR2 (recettore per il fattore di crescita 2 dell’insulina). Un’esaustiva analisi di queste alterazioni genetiche ha consentito di definire due differenti percorsi molecolari di epatocarcinogenesi in accordo alla presenza o meno di instabilità cromosomica. Tumori scarsamente differenziati ed HBV positivi fanno parte del gruppo di tumori ad alta instabilità cromosomica, associati a mutazioni di p53, mentre tumori ben differenziati e

HBV negativi sono stati associati ad assenza di instabilità cromosomica ed attivazione della via di β -catenina (**Figura 3**).

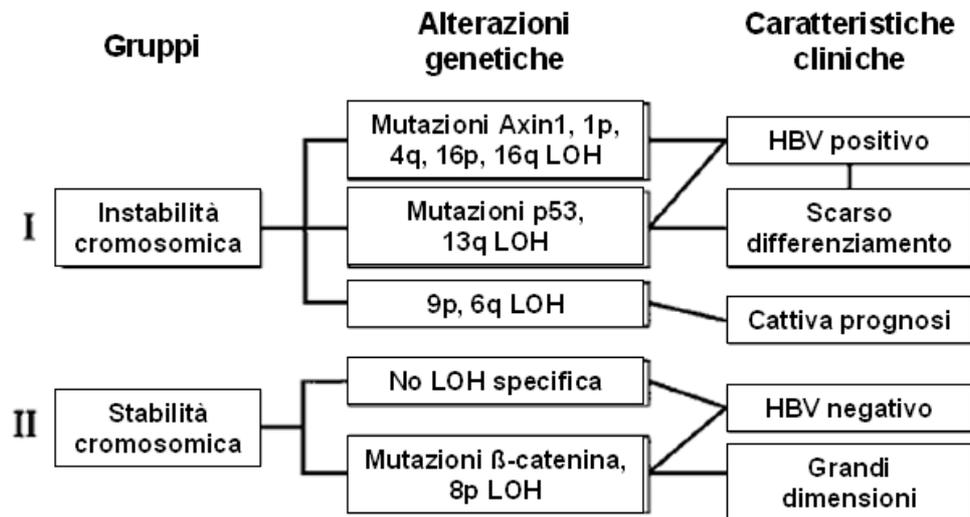


Figura 3. Principali pathway molecolari di epatocarcinogenesi. Gli HCC vengono raggruppati in base alle alterazioni genetiche ed in relazione ai parametri clinici. Le linee che uniscono i rettangoli indicano una correlazione significativa. LOH: perdita di eterozigosi. (Figura da: Laurent-Puig, P. and Zucman-Rossi, J. Oncogene. 2006. 25:3778-86).

Un'ulteriore classificazione molecolare dell'epatocarcinoma è stata eseguita da Chaing *et al* (14), ed ha consentito di individuare cinque classi di espressione genica che raggruppano univocamente i tessuti di HCC in stadio precoce ed HCV positivi. In aggiunta, la combinazione di tali profili di espressione con analisi di mutazioni, analisi immunohistochimiche e lo studio di pathway molecolari ha consentito di associare tre di queste cinque classi di espressione genica ad alterazioni di pathway di trasduzione del segnale già noti in letteratura. Ad esempio nella classe con alto indice di proliferazione è stata osservata un'aumentata fosforilazione di IGF-IR, AKT e RPS6, facendo supporre che

l'attivazione di molecole ad attività tirosina cinasica potesse essere l'elemento scatenante dell'elevata proliferazione osservata in questo sottogruppo di tumori. Alla luce della significativa concordanza con altri studi di espressione, queste cinque classi potrebbero quindi essere utilizzate per la stratificazione dei pazienti nei futuri trials clinici e per l'individuazione di potenziali target per la terapia molecolare. Gli studi di classificazione molecolare possiedono quindi un'importante rilevanza clinica poiché potrebbero portare all'identificazione di marcatori utili per la diagnosi precoce del tumore, per predire la prognosi o per identificare nuovi bersagli terapeutici.

Il recente studio di Ladeiro *et al* (15) ha integrato la classificazione molecolare dell'epatocarcinoma basata sulle alterazioni geniche con lo studio dei profili di espressione dei microRNA, al fine di individuare associazioni tra mutazioni in oncogeni/geni oncosoppressori e caratteristiche clinico-patologiche. L'analisi di profiling dei microRNA ha consentito di classificare univocamente i campioni in esame in gruppi ben separati tra loro e contraddistinti da caratteristiche istologiche (tumore/non tumore, tumore benigno/maligno), caratteristiche cliniche (infezione da HBV, consumo di alcol) e mutazioni in oncogeni/geni oncosoppressori (β -catenina, fattore epatico nucleare 1 (HFN1)). Tale studio dimostra che l'epatocarcinoma possiede distinti profili di espressione dei microRNA, i quali sono in relazione al grado di malignità, ai fattori di rischio ed alle alterazioni geniche e fornisce una nuova ipotesi per comprendere l'impatto funzionale della deregolazione dei microRNA nella tumorigenesi epatica e per il loro utilizzo come marcatori diagnostici.

1.2 I microRNA

I microRNA (miRNA) sono delle piccole molecole di RNA non codificante, della lunghezza di 19-22 nucleotidi, sono espressi in un numero molto elevato di organismi, incluso l'*Homo Sapiens*, sono filogeneticamente molto conservati, e possiedono un'elevata specificità di tessuto e dei vari stadi di sviluppo. E' stato di recente dimostrato il ruolo cruciale dei microRNA nella regolazione di importanti processi fisiologici, quali lo sviluppo, la proliferazione, il differenziamento, l'apoptosi e la risposta a differenti segnali extracellulari e di stress.

La scoperta dei microRNA è piuttosto recente, risale infatti al 1993 quando un piccolo RNA codificato dal locus *lin-4* fu associato al tempo di sviluppo del nematode *Caenorhabditis elegans*, attraverso la modulazione della proteina *lin-14.1* (16); ma è solo negli ultimi anni che i miRNA sono entrati a far parte del complesso circuito della biologia cellulare, rivelando il loro ruolo chiave come modulatori dell'espressione genica.

Analisi computazionali indicano che i geni che codificano per i microRNA rappresentano approssimativamente l'1% del genoma delle differenti specie, e che ognuno di loro possiede sequenze conservate o non conservate in centinaia di differenti geni bersaglio: è stato stimato infatti che circa il 30% dei geni sono regolati da almeno un microRNA (17). Al momento attuale, centinaia di miRNA sono stati predetti in animali, piante e virus attraverso differenti approcci (18), tra cui metodi sperimentali (19), approcci computazionali (20) ed analisi di sequenze genomiche ed EST (21, 22). Ad oggi sono stati individuati e validati sperimentalmente 721 miRNA umani, come riportato dal database dei microRNA, miRBase (<http://www.mirbase.org>).

La maggior parte dei geni che codificano per i microRNA hanno isoforme multiple (paraloghi) che sono probabilmente il risultato della duplicazione genica; per esempio il genoma umano possiede 12 loci per la famiglia del miRNA let-7. I geni paraloghi hanno spesso una sequenza identica nella porzione 5' relativa alle posizioni nucleotidiche 2-7. Poiché questi sei nucleotidi '*seed sequence*' sono cruciali per l'appaiamento con l'mRNA bersaglio, si pensa che i geni paraloghi agiscano in maniera ridondante. In realtà, essendo anche la porzione 3' dei miRNA importante per l'appaiamento con l'mRNA bersaglio, e poiché questi miRNA hanno spesso pattern di espressione differenti, membri della famiglia con la stessa '*seed sequence*' possono avere ruoli distinti *in vivo* (23). Approssimativamente il 50% dei loci dei miRNA nei mammiferi sono in stretta vicinanza con altri miRNA e spesso questi cluster di microRNA sono trascritti come singola unità trascrizionale (TU) policistronica (24); nonostante esistano casi eccezionali nei quali tali microRNA vengono individualmente trascritti da promotori separati. Alcuni microRNA sono generati da TU non codificanti, mentre altri sono all'interno di TU codificanti proteine. Approssimativamente il 40% dei loci dei miRNA sono localizzati in regioni introniche di TU non codificanti, mentre il 10% è situato in regioni esoniche. I loci dei miRNA che si trovano in TU codificanti proteine sono localizzati generalmente in regioni introniche, le quali rappresentano il 40% di tutti i loci dei microRNA (**Figura 3**). Alcuni loci di miRNA vengono definiti 'misti', poiché la loro localizzazione è intronica o esonica a seconda del pattern di splicing (25).

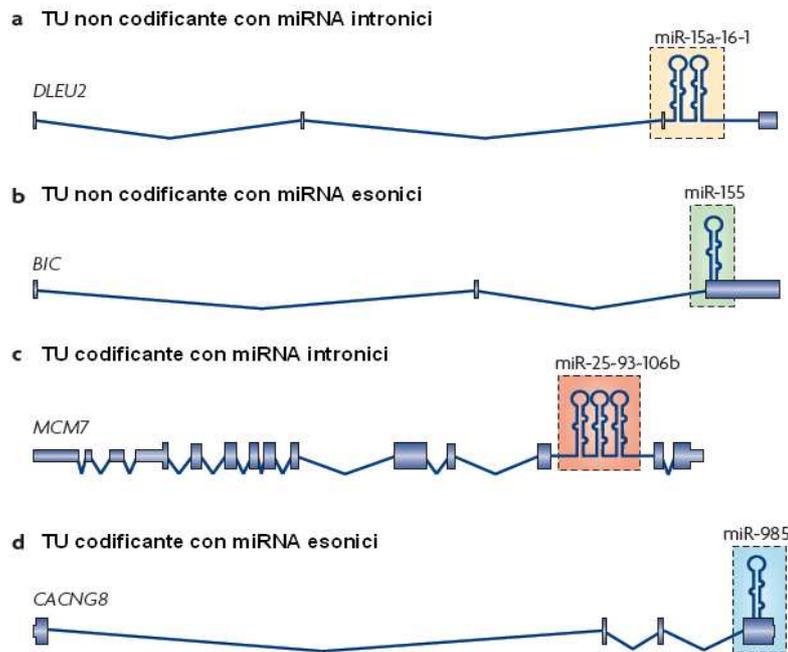


Figura 3. Localizzazione genomica e struttura dei microRNA. (Figura da: Kim, VN. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009. 10: 126-39).

1.2.1 Biogenesi e ruolo biologico dei microRNA

La maggior parte dei microRNA viene trascritta dalla RNA polimerasi II (Pol II) (24, 26), sebbene un minor gruppo di miRNA associati a sequenze ripetute (Alu) può essere trascritto dalla RNA polimerasi III (27). Un ampio numero di fattori di trascrizione associati alla Pol II controllano la trascrizione genica dei microRNA, consentendone una fine regolazione in specifiche condizioni e tipi cellulari (28). I microRNA vengono codificati sotto forma di lunghi trascritti primari caratterizzati da una complessa struttura a forcina (pri-miRNA) e sono processati nel nucleo dalla RNasi III Drosha a formare un microRNA precursore (pre-miRNA) della lunghezza di 70-100 nucleotidi. Queste molecole precursore vengono esportate, attraverso un meccanismo mediato dall'Esportina 5, dal nucleo al citoplasma dove un ulteriore step di maturazione mediato dall'RNasi III

Dicer genera un RNA a doppio filamento (dsRNA) della lunghezza di circa 22 nucleotidi, chiamato dsmiR/miR*. Tale dsRNA viene successivamente legato dalla proteina Argonaute (Ago) ed incorporato nel complesso proteico noto come 'complesso che induce il silenziamento di RNA' (RISC). A questo punto, uno dei due filamenti (filamento guida o miRNA) rimane legato ad Argonaute e costituirà il miRNA maturo, mentre l'altro filamento (filamento passeggero o miRNA*) sarà sottoposto a degradazione da parte di un enzima con attività di elicasi. La stabilità termodinamica di entrambe le estremità del dsRNA è fondamentale nella determinazione di quale sarà il filamento guida (29, 30). All'interno del complesso proteico del RISC il miRNA maturo è in grado di appaiarsi a sequenze complementari presenti nella regione 3'UTR di RNA messaggeri (mRNA) e di regolarne l'espressione genica a livello post-trascrizionale. La regolazione da parte dei miRNA avviene attraverso due differenti meccanismi d'azione che variano a seconda della complementarità della basi tra il microRNA ed il suo sito bersaglio. Quando vi è il 100% di complementarità, meccanismo che avviene più di frequente nelle piante, l'appaiamento del microRNA determinerà la degradazione dell'mRNA; viceversa, quando la complementarità delle basi è imperfetta, meccanismo che avviene più di frequente negli animali, l'appaiamento del microRNA al suo sito bersaglio porterà più probabilmente al blocco della traduzione, senza la degradazione dell'mRNA (**Figura 4**).

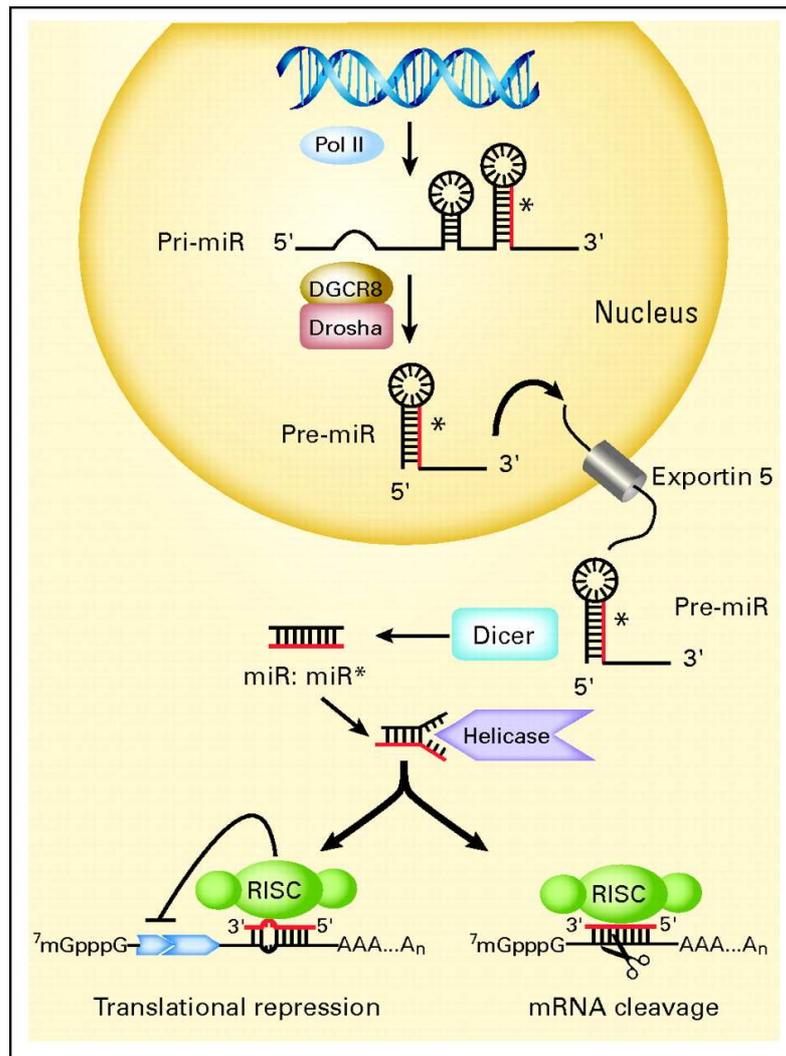


Figura 4. Biogenesi, processazione e maturazione dei microRNA (miR).
(Figura da: [Iorio, MV et al. J Clin Oncol. 2009. 27:5848-5856](#)).

Il pattern di espressione dei microRNA è regolato durante lo sviluppo ed è generalmente tessuto specifico. Alcuni miRNA sono molto abbondanti, più di 10000 copie per cellula (31), mentre altri sono scarsamente rivelabili con tecniche di ibridazione all'RNA totale (32). Esistono, infatti, microRNA organo-specifici come il miR-122 nel fegato ed il miR-124 nel cervello che non presenti in altri tessuti, mentre vi sono miRNA particolarmente abbondanti in un tessuto, come ad esempio il miR-1 nel tessuto muscolare scheletrico (33), che possono tuttavia essere ritrovati anche in altri tessuti. L'elevata conservazione di questi microRNA

organo-specifici tra le varie specie animali suggerisce che essi potrebbero giocare un ruolo ben preciso e filogeneticamente conservato nella costituzione e/o mantenimento di un tipo cellulare o tissutale di un determinato organo. A questo proposito, è interessante notare che i miRNA sono stati individuati solo in organismi multicellulari, mentre sono assenti in organismi unicellulari, e potrebbero perciò essere essenziali per il differenziamento dei vari tipi di tessuto e per il mantenimento dello stato differenziativo. Vi sono infatti evidenze sperimentali che dimostrano l'importanza dei miRNA nello sviluppo precoce e tardivo dei vertebrati (34). Negli ultimi anni sta quindi diventando sempre più rilevante l'importanza dei microRNA nel controllo dello sviluppo, della fisiologia e della patologia animale.

A questo riguardo, l'individuazione e la caratterizzazione dei bersagli e dei pathway molecolari regolati dai miRNA rappresenta uno step fondamentale per far luce sull'ampio spettro di azioni biologiche esercitate dai microRNA. A fianco dell'analisi genetica, è quindi necessario eseguire un'accurata analisi computazionale ed una successiva analisi funzionale *in vitro*. L'analisi *in silico* prevede l'utilizzo di algoritmi bioinformatici quali TargetScan (<http://genes.mit.edu/targetscan/>), PicTar (<http://pictar.bio.nyu.edu/>) e miRanda (<http://cbio.mskcc.org/cgi-bin/mirnaviewer/mirnaviewer.pl>) che vengono utilizzati per la predizione dei target biologici dei microRNA. Tali algoritmi si basano su programmi di allineamento che consentono di individuare sequenze conservate di 7-8 nucleotidi con un'elevata complementarietà alle 'seed sequence' dei miRNA ed un'alta stabilità termodinamica, con punteggi che variano da 0 a 100, dove 0 rappresenta nessuna complementarietà e 100 perfetta complementarietà. L'analisi *in silico* dovrà essere successivamente affiancata da

un'analisi funzionale *in vitro*, al fine di dimostrare l'effettiva regolazione dei geni bersaglio da parte dei miRNA, e da studi con geni reporter al fine di dimostrare l'interazione diretta tra il miRNA ed il sito complementare presente nel 3'UTR dell'mRNA bersaglio.

1.2.2 MicroRNA e cancro

L'identificazione di due microRNA, miR-15a e miR-16a, localizzati in una regione di delezione di 30 kb nel cromosoma 13q14, individuata nel 50% delle leucemie linfatiche croniche (CLL) (35), è stata una delle prime indicazioni del possibile coinvolgimento dei microRNA nella tumorigenesi umana.

Dopo questa prima evidenza sperimentale, è stata riportata la correlazione tra le posizioni genomiche di un largo numero di miRNA e regioni genomiche cancro-associate (36). In questo studio sono stati mappati 186 geni di miRNA ed è stato osservato che la loro distribuzione non è casuale ed omogenea tra i vari cromosomi; infatti, circa il 50% dei loci analizzati risultano localizzati in cluster, con una media di 2.5 geni per cluster. Circa il 20% dei miRNA analizzati sono stati associati a siti fragili del genoma umano (**Figura 5**) o siti di integrazione del Papilloma Virus Umano (HPV). Molte evidenze sperimentali supportano la correlazione tra siti fragili e l'instabilità del DNA nelle cellule cancerose. Infatti, i siti fragili sono siti preferenziali per scambi di cromatidi fratelli, traslocazioni, delezioni, amplificazioni o integrazioni di virus associati a tumori come l'HPV.

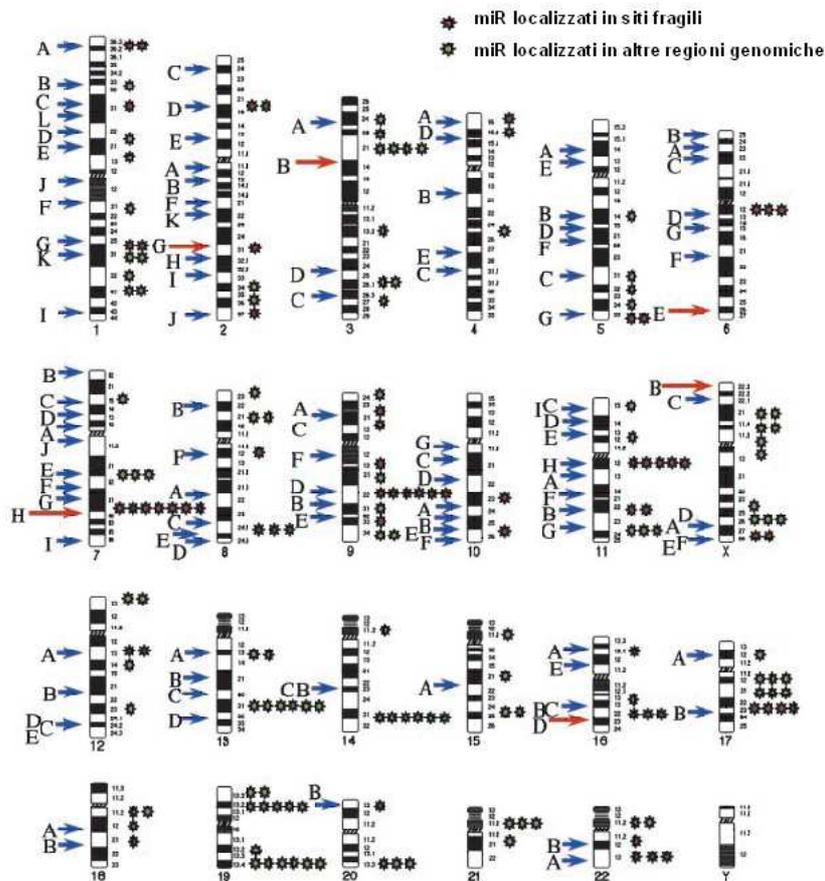


Figura 5. Correlazione tra siti fragili e microRNA. Cariotipo umano dove sono mostrati 113 siti fragili e 186 microRNA. I miRNA che sono co-localizzati con i siti fragili sono in rosso. Le frecce rosse mostrano i siti fragili osservati più di frequente nei tumori umani. (Figura da: Calin, GA et al. PNAS. 2004. 101:2999-3004).

Oltre all'associazione con i siti fragili, i geni dei microRNA possono essere coinvolti nel processo di tumorigenesi attraverso altri meccanismi, quali mutazione puntiforme, delezione, amplificazione, traslocazione o modificazioni epigenetiche. Circa il 50% dei 186 miRNA analizzati sono stati individuati all'interno di regioni genomiche associate al cancro (CAGRs), tra cui regioni minime di perdita di eterozigosi (LOH), nelle quali sono frequentemente ritrovati geni oncosoppressori (TS), o regioni minime di amplificazione, dove sono spesso localizzati oncogeni (OG). Da tale analisi risulta perciò evidente che i microRNA

possono comportarsi da oncogeni o geni oncosoppressori e, sorprendentemente, lo stesso miRNA può comportarsi da TS od OG a seconda del tipo di alterazione, tipo cellulare o regolazione trascrizionale/post-trascrizionale di geni target; infatti, specifici miRNA sono stati infatti ritrovati sia in regioni di delezione che di amplificazione a seconda del tipo di tumore analizzato.

Per quanto riguarda le modificazioni epigenetiche, quali alterata metilazione/acetilazione del DNA, un'estensiva analisi genomica delle sequenze geniche che codificano per i miRNA ha evidenziato che circa il 50% dei loci sono associati con isole CpG (37), facendo supporre che un alterato stato di metilazione potrebbe essere responsabile della deregolazione di miRNA nei tumori (38).

Alla luce del meccanismo d'azione dei miRNA, la loro deregolazione potrebbe causare un 'collasso post-trascrizionale', ovvero la misregolazione contemporanea di molteplici TS ed OG che possiedono sequenze complementari a quella del miRNA in questione (39). L'effetto globale in caso di inattivazione di un miRNA sarà la sovraespressione dei suoi geni target, mentre la sua attivazione porterà alla sottoespressione di centinaia di geni bersaglio. Qualora i geni target dei miRNA deregolati siano coinvolti nella regolazione di importanti processi biologici come apoptosi, ciclo cellulare, invasività od angiogenesi, vi sarà un aumentato rischio di crescita incontrollata e di sviluppo dei tumori (**Figura 6**). In aggiunta, essendo un singolo miRNA in grado di regolare l'espressione genica di centinaia di geni bersaglio, la sua alterata espressione cellulare porterà alla deregolazione di numerosi pathway molecolari che potrebbero contribuire, separatamente o sinergicamente, all'instaurarsi di un fenotipo cellulare di natura maligna.

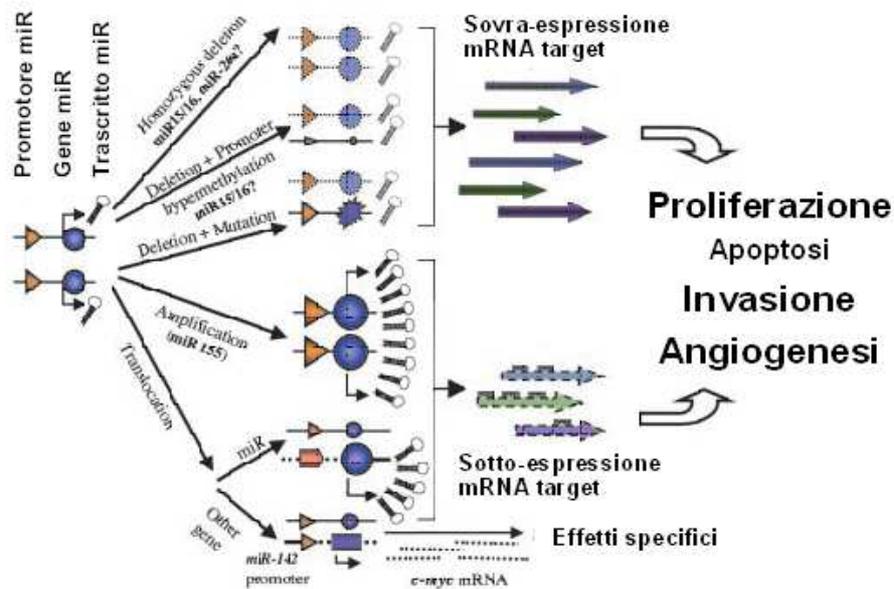


Figura 6. Meccanismi di deregolazione dei microRNA nei tumori umani.
(Figura da: Calin, GA et al. PNAS. 2004. 101:2999-3004).

In aggiunta, l'individuazione di differenti profili di espressione dei microRNA nel tessuto neoplastico rispetto alla sua controparte normale conferma l'ipotesi di un probabile coinvolgimento dei miRNA nello sviluppo e nella progressione tumorale. Nello studio di Volinia *et al* (40), un'analisi di microarray di microRNA su 540 campioni provenienti da diversi tipi tumorali (polmone, mammella, stomaco, prostata, colon e pancreas) ha consentito di individuare una *signature* di microRNA in grado di accomunare tra loro differenti tumori solidi. A conferma della significatività di questo studio, la variazione di espressione dei miRNA della *signature* risulta spesso univoca tra i vari tipi di cancro, suggerendo un meccanismo comune di coinvolgimento dei miRNA nella tumorigenesi umana. In aggiunta, all'interno di questa *signature* sono stati ritrovati miRNA di cui era già nota l'associazione con altri tumori umani, tra cui miR-17-5p, miR-20a, miR-21, miR-92, miR-106a, e miR-155, ed i bersagli molecolari di questi miRNA risultano significativamente arricchiti di TS ed OG. Tali dati suggeriscono il forte

coinvolgimento dei microRNA nella patogenesi dei tumori solidi e supportano la funzione dei miRNA come geni tumorali sia di natura dominante che recessiva.

E' stato inoltre dimostrato il ruolo dei microRNA non solo nelle fasi iniziali di sviluppo dei tumori primari, ma anche nelle fasi di progressione e metastatizzazione della malattia. Infatti, numerose evidenze sperimentali mostrano il coinvolgimento dei miRNA nella regolazione di processi biologici che portano all'acquisizione del potenziale metastatico, tra cui l'adesione, l'invasione, la migrazione, la transizione epiteliale-mesenchimale (EMT) e l'angiogenesi (41, 42).

I microRNA possono quindi essere considerati a tutti gli effetti come dei veri e propri oncogeni o geni oncosoppressori, ed attualmente è stato ampiamente riportato il loro coinvolgimento in tutte le fasi di sviluppo di un tumore umano.

1.2.3 MicroRNA ed epatocarcinoma

Ad oggi numerosi studi riportano l'analisi dei profili di espressione dei microRNA nell'epatocarcinoma umano ed in modelli sperimentali di HCC (43-49). Questi studi riportano l'espressione aberrante di specifici microRNA nelle cellule o nei tessuti di HCC se confrontati ad epatociti o tessuti di natura non maligna. Tra i microRNA sovraespressi nell'HCC sono stati riportati il miR-21, i miR-221/222 ed il miR-224, mentre tra i miRNA sottoespressi nel tumore vi sono il miR-122, il miR-145, il miR-34a ed il miR-199a. Da notare il fatto che, nonostante l'eterogeneità dell'HCC legata ai numerosi fattori di rischio, alcuni miRNA aberrantemente espressi sono stati ritrovati da più gruppi di ricerca, avvalorando il loro ruolo bio-patologico ed il loro coinvolgimento nel processo di

epatocarcinogenesi, indipendentemente dai meccanismi di trasformazione degli HCC analizzati.

Per quel che riguarda l'eziologia ed i fattori di rischio dell'HCC, numerosi studi riportano la deregolazione di specifici miRNA in fegati cirrotici ed in fegati affetti da epatiti virali. Nello studio di Jiang *et al* (50) è stata riportata un'associazione tra gli aumentati livelli di espressione di numerosi miRNA e la co-presenza di cirrosi ed infezioni da virus dell'epatite. In accordo con tali dati, sono stati individuati miRNA differenzialmente espressi in pazienti con HCC in base al tipo di infezione virale sottostante, HBV o HCV. Un'analisi computazionale dei geni target dei miRNA associati all'infezione virale ha inoltre messo in evidenza l'attivazione di pathway relativi alla morte cellulare, al danno al DNA, alla ricombinazione in fegati infetti da HBV e, viceversa, all'attivazione di pathway connessi alla risposta immunitaria, al ciclo cellulare, alla proteolisi ed al metabolismo lipidico in fegati infetti da HCV (51).

Relativamente al coinvolgimento dei miRNA nei diversi stadi della progressione tumorale dell'HCC, Murakami *et al* (43) ha mostrato una correlazione tra i miR-222, miR-106a, miR-92, miR-17-5p, miR-20 e miR-18 ed il grado di differenziamento degli HCC, suggerendo un coinvolgimento di un ristretto numero di miRNA nella progressione della patologia. In accordo con questo dato, Budhu *et al* (47) ha riportato una *signature* di 20 miRNA in grado di distinguere i tessuti di HCC primario con metastasi venose dai tumori solitari privi di metastasi. In aggiunta, un'analisi predittiva ha rivelato che la maggior parte dei 20 miRNA di questa *signature* sono associati con la sopravvivenza dei pazienti. Tali 20 miRNA potrebbero quindi rappresentare un semplice metodo di profiling diagnostico/prognostico in grado di identificare pazienti con HCC che

probabilmente svilupperanno metastasi e/o recidiva epatica. Un altro studio ha riportato differenti profili di espressione tra l'epatocarcinoma ed il colangiocarcinoma, un tumore epatico delle vie biliari, dato che sottolinea l'importanza dei miRNA come nuovi marcatori molecolari e come utili strumenti per definire il fenotipo clinico di un tumore epatico primario (52).

Allo scopo di caratterizzare il ruolo biologico e funzionale dei singoli miRNA nel processo di epatocarcinogenesi sono stati individuati alcuni dei pathway molecolari modulati da singoli miRNA deregolati nell'HCC. Uno dei miRNA maggiormente caratterizzato nell'HCC è il microRNA epatospecifico, miR-122, il quale rappresenta il 70% di tutti i miRNA espressi nel fegato ed è sottoespresso nella maggior parte degli HCC sia umani che murini. La sua deregolazione provoca importanti conseguenze su varie funzioni epatiche, infatti tra i suoi target molecolari sono inclusi numerosi geni relativi al fenotipo degli epatociti adulti, al metabolismo lipidico (53) ed alla sintesi del colesterolo (54); tali dati fanno ipotizzare una correlazione tra la diminuita espressione del miR-122 nell'HCC e la perdita del differenziamento epatico delle cellule tumorali. In aggiunta, Jopling *et al* (55) hanno dimostrato che il miR-122 è in grado di legarsi alla regione 5'UTR dell'RNA del virus dell'HCV, regione conservata in tutti e sei i genotipi virali, suggerendo che il miR-122 è un elemento essenziale per la replicazione del virus negli epatociti. E' stato infatti dimostrato che l'inattivazione funzionale del miR-122 porta all'80% di riduzione della replicazione virale; facendo ipotizzare che la perdita del miR-122 nell'HCC potrebbe aumentare la resistenza delle cellule cancerose alla replicazione dell'HCV.

Un secondo miRNA che sembra giocare un ruolo chiave nel processo di epatocarcinogenesi è il miR-21; analisi di microarray dimostrano infatti che tale

miRNA è spesso sovraespresso nei tumori e nelle linee cellulari di HCC. Lo studio di Meng *et al* (44) ha individuato il gene oncosoppressore PTEN tra i bersagli molecolari del miR-21. Analisi *in vitro*, mostrano come la sua inibizione sia associata ad un'aumentata espressione di PTEN e porti ad una diminuita proliferazione ed invasione delle cellule tumorali. L'inibizione del miR-21 induce inoltre un'alterata espressione delle metallo-proteinasi 2 e 9, entrambi mediatori a valle di PTEN con un noto ruolo nei processi di migrazione ed invasione cellulare. Tali dati suggeriscono che l'aberrante espressione del miR-21 possa contribuire alla crescita ed alla diffusione dell'HCC attraverso la modulazione dell'espressione di PTEN e dei pathway PTEN-dipendenti coinvolti nella modulazione delle caratteristiche fenotipiche delle cellule cancerose, quali proliferazione, migrazione ed invasione.

Un altro miRNA coinvolto nella progressione e diffusione tumorale dell'HCC è il miR-34a, un bersaglio trascrizionale di p53 che risulta deletato in numerosi tipi di tumore umano. Oltre a bersagli molecolari coinvolti nella progressione del ciclo cellulare, il miR-34a regola l'espressione dell'oncoproteina c-Met, un recettore con attività di tirosina chinasi attivato dal legame del fattore di crescita epatico (HGF) in grado di indurre la fosforilazione di molecole responsabili della traduzione del segnale, quali ERK1/2, e che rappresentano fattori chiave nella regolazione dell'invasione e della migrazione tumorale. Lo studio di Li *et al* (42) ha riportato una significativa diminuzione dell'espressione del miR-34a nella maggior parte dei tessuti di HCC rispetto all'adiacente fegato sano ed una correlazione inversa tra il miR-34a ed i livelli di espressione dell'oncoproteina c-Met. In aggiunta, bassi livelli di miR-34a correlano positivamente con la metastatizzazione e l'invasione vascolare del tumore e studi *in vitro* mostrano una

diminuita capacità migratoria ed invasiva delle cellule tumorali in seguito all'espressione ectopica del miR-34a, in maniera c-Met dipendente. Da notare che un secondo miRNA diminuito nella maggior parte degli HCC (50), miR-199a-3p, è in grado di regolare l'espressione dell'oncogene c-Met (56); tale dato suggerisce che più miRNA deregolati in un tumore possono modulare sinergicamente il medesimo gene bersaglio, portando ad una forte alterazione del pathway molecolare a valle del gene target e favorendo il processo di progressione tumorale.

Presi insieme, tutti questi studi dimostrano il ruolo chiave dei microRNA nei diversi stadi di iniziazione e progressione dell'epatocarcinoma e pongono le basi per lo sviluppo di nuovi trattamenti terapeutici per l'HCC. A tale scopo, la ricostituzione di miRNA sottoespressi od il silenziamento di miRNA sovraspressi nelle cellule cancerose rappresenta un promettente tool terapeutico per la terapia genica del cancro, ed offre la possibilità di modulare il fenotipo tumorale maligno regolando contemporaneamente più di un gene target. A tal proposito, il fegato risulta estremamente ricettivo nell'assorbimento di oligonucleotidi somministrati perifericamente, e rappresenta perciò un organo ideale per la terapia genica. Inoltre, efficienti vie per la somministrazione selettiva di farmaci direttamente all'interno dell'arteria che alimenta il nodulo tumorale sono state sviluppate e routinariamente utilizzate nella pratica clinica, consentendo una maggiore efficacia e minore tossicità sistemica dei trattamenti somministrati.

1.2.4 MicroRNA e clinica: diagnosi, prognosi e nuovi trattamenti

Le evidenze sperimentali raccolte sino ad oggi dimostrano che i microRNA possono rappresentare dei validi marcatori diagnostici e prognostici nei tumori umani. L'espressione aberrante dei miRNA nei differenti tipi di tumore è stata infatti correlata a specifiche caratteristiche bio-patologiche, all'esito della malattia ed alla risposta a trattamenti farmacologici.

- Ruolo diagnostico dei microRNA

L'analisi dei profili di espressione dei miRNA in un elevato numero di campioni tumorali ha recentemente mostrato il potenziale diagnostico delle firme molecolari dei microRNA nell'individuazione di un determinato fenotipo tumorale (40, 57). Nello studio di Fulci *et al* (58) sono stati ad esempio analizzati campioni provenienti da pazienti con leucemia acuta ed in essi sono stati individuati distinti pattern di espressione dei miRNA corrispondenti a differenti meccanismi di trasformazione tumorale. In questo studio l'utilizzo dei profili di espressione dei miRNA è risultato perciò un ottimo strumento per stabilire la corretta diagnosi di pazienti con tumori poco differenziati ed altrimenti non diagnosticabili dalla sola analisi isto-patologica.

- Ruolo prognostico dei microRNA

L'utilità dei profili di espressione dei miRNA è al momento evidente per la prognosi di alcuni tipi di neoplasia; ad esempio nella leucemia linfatica cronica (CLL) e nel tumore del polmone specifiche *signature* di espressione sono state associate ad una prognosi di tipo favorevole o sfavorevole (58-60). Nello studio condotto da Takamizawa *et al* (61) è stato dimostrato che 143 casi di tumore del polmone possono essere classificati in due grandi gruppi in base alla sola

espressione del microRNA let-7, ed in aggiunta è stata osservata una correlazione tra bassi livelli di let-7 ed una significativa diminuzione del tempo di sopravvivenza dei pazienti. Sorprendentemente, i livelli di espressione di let-7 sono risultati un più potente fattore di predizione rispetto all'età, all'istologia del tumore ed al fumo. Una possibile spiegazione molecolare a questa correlazione proviene dallo studio di Johnson *et al* (62) nel quale è stata riportata la correlazione tra let-7 e l'oncogene RAS, un noto marcatore prognostico di pazienti con tumore al polmone. Un'ulteriore prova a sostegno del ruolo pro-oncogenico di let-7 nel cancro del polmone proviene da studi funzionali *in vitro*, nei quali la ri-espressione di let-7 in linee cellulari ha portato all'inibizione di pathway coinvolti nella proliferazione cellulare (63).

- Ruolo dei microRNA nella resistenza a trattamenti farmacologici

Uno dei più importanti fattori che influisce sulla probabilità di sopravvivenza di pazienti con neoplasia è la resistenza ai trattamenti terapeutici ed a questo riguardo lo sviluppo di approcci farmacologici efficaci è uno step necessario per la terapia dei differenti tipi di cancro.

In base alla loro tossicità specifica contro le cellule maligne, diverse forme ricombinanti di TRAIL risultano tra i più promettenti agenti anti-tumorali basati sull'induzione di apoptosi di cellule cancerose. Nonostante questo, molte cellule tumorali umane risultano resistenti all'apoptosi indotta dal TRAIL ed inoltre il meccanismo di tale resistenza è ad oggi ancora poco chiaro. Lo studio condotto da Garofano *et al* (64) ha dimostrato che i miR-221/222, attraverso la regolazione dei due target molecolari PTEN e TIMP3, inducono la resistenza al trattamento con TRAIL ricombinante ed aumentano la migrazione cellulare in seguito all'attivazione del pathway di AKT e delle metalloproteinasi. Tali microRNA

risultano sovraespressi in numerosi tipi di cancro tra cui l'epatocarcinoma ed il tumore del polmone (NSCLC) se confrontati con i rispettivi tessuti sani. Tale studio dimostra che l'alta espressione dei miR-221/222 è indice di resistenza al trattamento con TRAIL in questi due tipi di tumore, e conferma precedenti evidenze sperimentali nelle quali veniva ipotizzata l'associazione tra un numero ristretto di microRNA e la sensibilità delle cellule tumorali alla morte cellulare farmaco-indotta. In particolare, la stratificazione tumorale sulla base dei livelli di espressione di miR-221/222 potrebbe essere uno strumento prognostico utile per predire la resistenza o la sensibilità al trattamento con TRAIL. In aggiunta, l'utilizzo di microRNA come innovativo trattamento terapeutico, potrebbe non solo sensibilizzare le cellule tumorali all'apoptosi farmaco-indotta (64, 65), ma anche inibirne la sopravvivenza, la proliferazione e la capacità invasiva.

E' stato inoltre dimostrato che alcuni microRNA possono modulare la sensibilità alla radioterapia, come di recente riportato da Slack *et al* (66) nel cancro del polmone; la ri-espressione di let-7 è infatti in grado di sopprimere la resistenza alla radioterapia, probabilmente attraverso la regolazione dell'oncogene RAS. Tali dati offrono le basi sperimentali per l'uso dei microRNA come nuovi target terapeutici in associazione con i tradizionali trattamenti anti-tumorali.

- Ruolo dei microRNA come target terapeutici

Considerata l'importanza dei microRNA nello sviluppo, progressione e trattamento del cancro, il loro potenziale utilizzo nella terapia tumorale è al momento attuale oggetto di studio di numerosi gruppi di ricerca. Lo scopo è quello di modularne l'espressione introducendo miRNA sottoespressi nel cancro o inibendo l'espressione di oncomiR tramite molecole antagoniste. Il razionale teorico per il loro utilizzo si basa sul fatto che i miRNA sono molecole endogene

con azione di antisense in grado di regolare l'espressione di numerosi geni coinvolti nella sopravvivenza, proliferazione e differenziamento delle cellule eucariote.

Lo sviluppo di molecole simili ai microRNA ma con una più elevata emivita ed aumentata efficacia *in vivo*, quali oligonucleotidi modificati utilizzando acidi nucleici con struttura ad anello (LNA) (67), oligonucleotidi anti-miR (AMO) (68) e 'antagomirs' coniugati a molecole di colesterolo (54), è stato il primo passo nella traslazione dei progressi scientifici dell'ultimo decennio all'interno della pratica clinica. Attualmente i due principali ostacoli all'utilizzo di queste molecole in clinica sono rappresentati dallo sviluppo di modelli animali ingegnerizzati che consentano di studiare approfonditamente i microRNA cancro-associati ed il miglioramento dell'efficienza della somministrazione di oligonucleotidi *in vivo*. Per migliorare il delivery dei miRNA *in vivo*, i metodi testati negli studi pre-clinici per gli 'short-interfering RNA' (siRNA) o 'short heteroduplex RNA' (shRNA) (69) potrebbero essere applicati anche ai miRNA, con il vantaggio che questi ultimi sono in grado di regolare bersagli multipli in una sola volta, modulando un intero network di molecole. Alla luce del complesso scenario di regolazione in cui sono coinvolti i microRNA, sarà tuttavia necessario un ulteriore sforzo al fine di elucidare e caratterizzare il potenziale oncogenico od oncosoppressore di ciascun miRNA.

Dati ad oggi disponibili chiaramente supportano il ruolo dei miRNA nell'eziologia del cancro e suggeriscono un possibile impiego di queste molecole come marcatori diagnostici e prognostici e nuovi target o strumenti terapeutici. Il passaggio dal bancone di laboratorio all'impiego dei microRNA nelle

applicazioni cliniche potrebbe quindi rappresentare la sfida futura in ambito scientifico.

1.3 SCOPO DELLA RICERCA DI TESI

Il carcinoma epatocellulare (HCC) è il più frequente tumore maligno del fegato e rappresenta il sesto tipo di tumore più comune nel mondo. Spesso i pazienti con HCC vengono diagnosticati a stadi piuttosto avanzati, quando le uniche opzioni terapeutiche in grado di migliorarne la sopravvivenza sono la chemoembolizzazione dell'arteria epatica ed il trattamento con l'inibitore multi-cinamico, Sorafenib. In questo contesto, la scoperta del ruolo centrale dei microRNA (miRNA) nella tumorigenesi umana risulta di fondamentale importanza per lo sviluppo di nuovi marcatori diagnostici e bersagli terapeutici.

I microRNA (miRNA) sono delle piccole molecole di RNA non codificante, della lunghezza di 19-22 nucleotidi, filogeneticamente molto conservati, ed esercitano un ruolo cruciale nella regolazione di importanti processi fisiologici, quali sviluppo, proliferazione, differenziamento, apoptosi e risposta a numerosi segnali extracellulari e di stress. I miRNA sono inoltre responsabile della fine regolazione dell'espressione di centinaia di geni bersaglio attraverso il blocco della traduzione o la degradazione dell'mRNA target. Studi di profiling hanno evidenziato l'espressione aberrante di specifici miRNA in numerosi tipi di tumore umano.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di individuare un pannello di miRNA deregolati nell'epatocarcinoma umano e di caratterizzare il ruolo biologico di tre miRNA deregolati nell'HCC, al fine di individuare alcuni dei meccanismi molecolari alla base della trasformazione maligna miRNA-associata. La nostra ricerca è stata inoltre focalizzata nell'individuazione di nuovi bersagli e strumenti terapeutici, quali i microRNA, per il trattamento combinato di HCC in stadio intermedio-avanzato.

CAPITOLO 2

MATERIALI E METODI

2.1 Raccolta di campioni di pazienti con epatocarcinoma

I campioni biologici utilizzati in questo studio provengono da pazienti sottoposti a resezione epatica per carcinoma epatocellulare insorto su fegato cirrotico. I campioni tissutali sono stati raccolti immediatamente dopo la resezione epatica effettuata presso il reparto di Chirurgia Generale e Trapianti del Policlinico Sant'Orsola di Bologna. I campioni sono stati tagliati, inseriti all'interno di cryovials, immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a -80° .

I criteri di esclusione di pazienti dallo studio sono stati i seguenti: 1) precedente storia di trattamento locale o sistemico per HCC 2) presenza di tessuto non cirrotico circostante il nodulo di HCC.

2.2 Microarray di microRNA

- Marchatura degli RNA con biotina

Procedura:

Aggiungere 5 μ g di RNA totale ad una miscela di reazione contenente 1 μ g di primer oligonucleotidico marcato con [3'-(N)8-(A)12-biotin-(A)12-biotin-5'], in un volume finale di 12 μ l.

Incubare la miscela per 10' a 70 $^{\circ}$ C e raffreddare in ghiaccio.

Mantenendo la miscela in ghiaccio, aggiungere 4 μ l di 5X First-Strand Buffer (250 mM Tris-HCL pH 8.3, 375 mM Cloruro di Potassio, 15 mM Cloruro di Magnesio, 50 mM DTT), 2 μ l di DTT (0.1 M), 1 μ l di dNTP mix (10 mM) e 1 μ l di SuperScript II RNaseH⁻ reverse transcriptase (200 Units/ μ l, Invitrogen) in un volume finale di 20 μ l.

Incubare la miscela di reazione per 90' in un bagnetto a 37 $^{\circ}$ C, per consentire la sintesi del primo filamento di cDNA.

Dopo l'incubazione, aggiungere 3.5 μ l di NaOH (0.5 M)/EDTA (50 mM) ai 20 μ l della miscela di reazione.

Incubare a 65°C per 15' per consentire la denaturazione degli ibridi di RNA/DNA e la degradazione degli stampi di RNA.

Aggiungere 5 µl di Tris-HCl (pH 7.6, 1 M) per neutralizzare la miscela di reazione.

I campioni di RNA (target) così marcati sono stati conservati a -80°C fino all'ibridazione su chip.

- Ibridazione su array

Microarray chip: il microarray di miRNA utilizzato per l'analisi di profiling contiene 381 sonde spottate in triplicato, corrispondenti alle sequenze di 238 microRNA maturi e 143 precursori di microRNA umani. Tutte le sonde presenti sul microchip sono oligonucleotidi di 40-mer spottati tramite tecnologie di contatto e legati covalentemente ad una matrice polimerica.

Procedura:

Ibridizzare i target marcati su microarray in 6X SSPE (0.9 M Cloruro di Sodio/60 mM Fosfato di Sodio/8 mM EDTA, pH 7.4)/30% Formamide a 25°C per 18 h.

Fare un lavaggio in 0.75X TNT (Tris-HCl/Cloruro di Sodio/Tween 20) a 37°C per 40'.

Processare i chip usando una rivelazione diretta dei trascritti marcati con biotina tramite la formazione di un coniugato con Streptavidin-Alexa647.

I vetrini sono stati processati tramite GenePix 4000B scanner (Axon Instruments).

Le immagini sono state quantificate tramite GenePix Pro 6.0 (Axon Instruments).

- Analisi dei dati di microarray

I dati grezzi provenienti dai microarray di microRNA, lettura ad un colore, sono stati normalizzati ed analizzati attraverso il software GeneSpring® GX versione 7.3 (Agilent Technologies). Il software GeneSpring genera un unico valore per ogni miRNA, eseguendo la media dei replicati delle sonde presenti sul chip. I

campioni sono stati normalizzati utilizzando la normalizzazione mediana. Ogni campione proveniente da tessuto tumorale è stato normalizzato sul campione di fegato cirrotico proveniente dallo stesso paziente, quando disponibile, oppure sulla media dei campioni di cirrosi. MicroRNA differenzialmente espressi sono stati individuati utilizzando un filtro basato su di un 'fold change' di 1.3 combinato con un'ANOVA (Analysis of Variance) per il confronto di campioni di HCC contro i campioni di CE ($p < 0.05$), con una correzione Benjamini and Hochberg per la riduzione dei falsi positivi. La lista dei miRNA differenzialmente espressi è stata testata per il suo valore predittivo con i seguenti algoritmi: Prediction Analysis of Microarrays (PAM) (70) e Support Vector Machine (SVM) (71). L'analisi di 'unsupervised hierarchical cluster' è stata eseguita dopo il centrimento mediano su ogni chip utilizzando associazione mediana e correlazione Standard come misure di similarità. Il raggruppamento controllato è stato eseguito dopo la normalizzazione sulla mediana dei geni per sottolineare differenze tra i campioni.

2.3 Northern blot

- Corsa elettroforetica e trasferimento su nitrocellulosa

Materiali:

15% acrylamide, 7 M urea Criterion precasted gels (Biorad)

Criterion Cell (Biorad)

Criterion Blotter (Biorad)

Hybond N+ membrane (Amersham)

Di-ethyl-pyro-carbonate (DEPC) (Sigma)

SDS (Biorad)

TBE-Urea Sample Buffer (Biorad)

TrackIt 25bp DNA ladder (Invitrogen)

TrackIt 10bp DNA ladder (Invitrogen)

TBE 10X (1 L)

Tris base	107.8 g
Acido Borico	55.0 g
EDTA 0,5 M	40 ml

Autoclavare la soluzione per 30' a 121°C.

Diluire il TBE 10X in H₂O DEPC per ottenere TBE 1X.

H₂O DEPC (1 L)

Aggiungere 1 ml di di-ethyl-pyro-carbonate ad 1 L di H₂O milliQ.

Miscelare per inversione ed incubare overnight a temperatura ambiente (RT).

Autoclavare la soluzione per 30' a 121°C.

Procedura:

Prelevare un volume di RNA pari a 10 µg per ciascun campione e portare ad un volume di 15 µl con H₂O DEPC.

Aggiungere un ugual volume di 2X Sample Buffer.

Denaturare a 70°C per 10'.

Posizionare il gel precast nell'apparato per elettroforesi e riempire la vaschetta col Buffer di corsa, TBE 1X.

Caricare i campioni ed i marker di peso molecolare utilizzando puntali a capillare.

Correre il gel a 120V per 90'.

Rimuovere il gel dal supporto immergendolo in TBE 1X.

Colorare il gel con Etidio-Bromuro (Et-Br) per 30' in agitazione e fotografarlo al Fluor-S (Biorad).

Decolorare il gel in TBE 1X ed equilibrarlo in TBE 1X per il blotting.

Equilibrare anche la membrana in TBE 1X.

Montare l'apparato di trasferimento ed effettuare il blotting in TBE 1X freddo a 20V, overnight a 4°C.

Mettere la membrana per 30' in stufa a 80°C per cross-linkare l'RNA alla membrana.

- Pre-ibridazione della membrana

Materiali:

SDS (Biorad)

Dextran Sulphate (Sigma)

SSPE 20X (1L)

NaH₂PO₄ (0.1M) 27.6 g

NaCl (1.8 M) 175.3 g

EDTA (0.01 M) 9.4 g

Aggiungere 800 ml di H₂O DEPC e sciogliere in agitazione.

Portare a pH 7.4 con HaOH.

Autoclavare la soluzione per 30' a 121°C.

SDS 20% (200 ml)

SDS 40.0 g

Aggiungere 150 ml di H₂O DEPC e sciogliere a 50°C in agitazione.

Portare a volume.

Soluzione di ibridazione (500 ml)

NaH₂PO₄ (0.2 M) 27.6 g

SDS (7%) 175.0 ml di SDS 20%

Aggiungere 400 ml di H₂O DEPC e sciogliere in agitazione.

Portare a pH 7.0 e portare a volume con H₂O DEPC.

NB: filtrare la soluzione con filtro da 0.22 µm prima dell'uso.

Procedura:

Bagnare la membrana con SSPE 2X in una vaschetta.

Per la pre-ibridazione, trasferire la membrana nella soluzione di ibridazione filtrata a 37°C in agitazione per 1h.

- Marcatura della sonda e purificazione su colonna

Materiali:

P32-gamma-ATP (Amersham)

G25 Quick spin columns (Roche)

Kit: End labelling kit with polinucleotide kinase (PNK) (Roche)

La sequenza delle sonde oligonucleotidiche a DNA è riportata in Tabella 1.

Tabella 1. Sequenza delle sonde oligonucleotidiche.

Nome sonda	Sequenza
MiR-221	5'-GAAACCCAGCAGACAATGTAGCT-3'
MiR-122	5'-ACAAACACCATTGTCACACTCCA-3'
Let-7a-1	5'-AACTATACAACCTACTACCTCA-3'
U6RNA	5'-GCAGGGGCCATGCTAATCTTCTCTGTATCG-3'

Procedura:

Lavorare in una stanza adibita ad utilizzo di materiale radioattivo ed utilizzare le schermature in plexiglass.

Preparare la mix per la marcatura utilizzando End labelling kit with polinucleotide kinase (PNK) e procedere secondo il seguente schema:

Oligonucleotide (50ng/μl)	4 μl
PNK Buffer 10X	4 μl
PNK (10U/μl)	2 μl
Gamma ATP P ³² (10 μCi/μl)	10 μl
H2O DEPC	20 μl
<hr/>	
TOT	40 μl

Incubare per 1h a 37°C.

Bloccare la reazione in ghiaccio.

Prendere la colonna dal contenitore (4°C) ed invertirla 5-6 volte per risospendere la matrice.

Rimuovere il cappuccio superiore e poi la punta inferiore. Lasciar scendere il buffer per gravità e scartarlo.

Posizionare la colonna sul tubo e centrifugare 2' a 1100 g dentro una provetta da 15 ml.

Mantenere la colonna in posizione verticale, posizionare il DNA marcato (sonda) al centro della colonna.

Posizionare la colonna su di un nuovo tubo.

Centrifugare 4' a 1100 g per eluire il campione contenente la sonda marcata.

Scartare la colonna nel contenitore del radioattivo.

- Ibridazione della sonda su membrana e rilevazione del segnale radioattivo

Procedura:

Aggiungere alla sonda purificata 1 ml di soluzione di ibridazione e denaturare in H₂O bollente per 2'.

Aggiungere la sonda denaturata a 20 ml di soluzione di ibridazione filtrata.

Rimuovere la soluzione di pre-ibridazione dalla membrana.

Coprire la membrana con la soluzione di ibridazione a cui è stata aggiunta la sonda.

Incubare overnight in un bagnetto termostato a 42°C in leggera agitazione.

Svuotare la soluzione di ibridazione contenente la sonda radioattiva in una provetta da 50 ml e conservarla a -20°C.

Posizionare la membrana in una vaschetta più capiente e fare 2 lavaggi con 300 ml di soluzione di lavaggio (2X SSPE + 0.1% SDS) per 30' a 37°C.

Posizionare la membrana su di un contenitore apposito e far impressionare una lastra fotografica (Kodak). Posizionare la cassetta a -80°C per 20'.

Sviluppare la lastra in camera oscura utilizzando i liquidi di sviluppo Developer 1X e Fixer 1X (Kodak).

Acquisire le immagini digitali tramite Fluor-S MultiImager (Biorad) e quantificare l'intensità delle bande tramite il software Quantity-one (Biorad).

- Stripping

Posizionare la membrana all'interno di una vaschetta ed aggiungere una soluzione bollente di 0.1% SDS in H₂O DEPC per 10'.

Fare un lavaggio in SSPE 2X e re-incubare la membrana con una nuova sonda.

2.4 Colture cellulari

Materiali:

Tutte le linee cellulari utilizzate in questo lavoro di tesi sono linee derivate da carcinoma epatocellulare e sono state acquistate presso la American Type Culture Collection (ATCC).

Linee cellulari:

HepG2 (ATCC, HB-8065)

Hep3B (ATCC, HB-8064)

SNU398 (ATCC, CRL-2233)

SNU449 (ATCC, CRL-2234)

SNU182 (ATCC, CRL-2235)

SNU475 (ATCC Number CRL-2236)

Huh-7 (Provenienti dal Laboratorio del Prof. Alberti, Università di Padova)

Terreni di coltura:

- RPMI-1640 (ATCC): SNU398, SNU449, SNU182, SNU475, Huh-7
- Minimum Essential Medium (Eagle) (ATCC): HepG2, Hep3B

Fetal bovine serum (FBS) (ATCC)

PBS (1X) (ATCC)

Tripsina (ATCC)

Penicillina-Streptomicina (100X) (ATCC)

L-Glutamina (100X) (ATCC)

Fiasche colturali (Corning)

Doxorubicina (Pfizer)

Deferoxamina (Sigma)

Rapamicina (Sigma)

Polyhema (Sigma)

Procedure:

Le cellule sono state coltivate ed espanse a 37°C, in atmosfera al 5% di CO₂ in terreno contenente 10% FBS, L-Glutamina 2mM ed antibiotici 1X.

I diversi trattamenti farmacologici sono stati effettuati a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂ su cellule in fase di crescita esponenziale.

Quando è previsto pre-trattamento con:

- Doxorubicina, usare il composto alla concentrazione di 2.5-5 µg/ml per 24h
- Deferoxamina, usare il composto alle concentrazioni di 250 µM per 24h
- Rapamicina, usare il composto alle concentrazioni di 10 ng/ml per 24-48h.

- Tripsinizzazione

Eliminare il terreno di crescita da ciascuna fiasca.

Fare un lavaggio delle cellule con 3 ml di PBS.

Aggiungere 3 ml di tripsina.

Incubare le cellule per 5' a 37°C e 5% CO₂.

Aggiungere 3 ml di terreno di coltura per disattivare la tripsina.

Raccogliere le cellule in provette da 15 ml.

Centrifugare per 5' a 1200 rpm.

Scartare il sovrnatante.

Risospendere il pellet cellulare in 5 ml di terreno.

Aggiungere in nuova fiasca di coltura 1 ml della sospensione cellulare e 9 ml di terreno di coltura (diluizione 1:5).

- Pellet cellulari

Centrifugare le cellule tripsinizzate per 5' a 1200 rpm a 4°C.

Eliminare il sovrnatante.

Risospendere le cellule in 1 ml di PBS e trasferire in provette da 1.5 ml.

Centrifugare a 7500 rpm per 2' a 4°C. Eliminare il sovrnatante.

Congelare il pellet cellulare in azoto liquido e conservare a -80°C.

2.5 Trasfezione cellulare

Materiali:

Lipofectamine 2000 (Invitrogen)

OPTI-MEM I Reduced Serum Medium (GIBCO)

Piastre per colture cellulari da 6 e 24 pozzetti (Corning)

Pre-miR miRNA precursor, 5 nmol (Ambion)

Anti-miR miRNA inhibitor, 5 nmol (Ambion)

Pre-miR Negative Control #1, 5nmol (Ambion)

Anti-miR Negative Control #1, 5nmol (Ambion)

Small interfering RNA (siRNA) (vedi Tabella 2)

Vettori plasmidici: pGL3, pRL-TK (Promega), pp53TA, pTA (Clontech),

pGL3+regione 3'UTR clonata (vedi Paragrafo 2.13)

Tutti gli oligonucleotidi a RNA utilizzati per la sovra-espressione (pre-miR) o per il silenziamento (anti-miR) dei microRNA ed i loro controlli negativi sono stati utilizzati ad una concentrazione finale di 100 nM.

La sequenza e la concentrazione finale dei siRNA utilizzati per il silenziamento dei singoli geni sono riportate nella Tabella 2.

La trasfezione dei vettori plasmidici è stata eseguita in piastre da 24 pozzetti per la successiva esecuzione del saggio di luciferasi (Paragrafo 2.14). I vettori pGL3, pGL3-3'UTR, pp53TA e pTA sono stati utilizzati ad una concentrazione finale di 1.0 µg/ml; il vettore pRL-TK ad una concentrazione di 0.1 µg /ml.

Tabella 2. SiRNA utilizzati.

Gene	SiRNA	Sequenza (5'->3')	Conc. (nM)	Produttore
Cyclin G1	G1/238	TGGCCTCAGAATGACTGCAAGACTA-	40	Invitrogen
Cyclin G1	G1/832	GCAAGAGCTTGTATCCAAATGTTTA	40	Invitrogen
PPP2R5B	PPP2R5B-1	CGTCAGGAGTTATGGCAAGGTCTGG	10	IDT
Bmf	Bmf-1	GGAAATAGGAGGAGTCTAGAGTAGA	20	IDT
Puma	Puma	CACCATGTAGCATACTGGATT	20	Sigma
mTOR	mTOR	ACCATGAACCATGTCCTAAGCTGTG	20	IDT
c-Met	c-Met	GCCCAACTACAGAAATGGTTT	20	Sigma

Procedura:

Ventiquattro ore prima della trasfezione piastrare le linee cellulari ad una confluenza del 50% in terreno senza antibiotici in piastre da 24 o 6 pozzetti.

- Preparazione dei complessi con Lipofectamine 2000:

Aggiungere 50 µl (piastra da 24 pozzetti) o 250 µl (piastra da 6 pozzetti) di OPTI-MEM in due provette separate.

Aggiungere nella prima provetta un volume di oligonucleotidi (o vettore plasmidico, piastra da 24 pozzetti) al fine di ottenere le concentrazioni finali sopra indicate.

Aggiungere 1 µl (piastra da 24 pozzetti) o 5 µl (piastra da 6 pozzetti) di Lipofectamine 2000 nella seconda provetta, miscelare per inversione (4-6 volte) ed incubare a RT per 5'.

Centrifugare brevemente entrambe le provette (4000 rpm per 5'').

Prelevare i 50 µl o 250 µl di OPTI-MEM contenenti la Lipofectamine 2000 ed aggiungerli alla provetta contenente gli oligonucleotidi (o vettori plasmidici).

Miscelare per inversione ed incubare la provetta a RT per 20'.

Eliminare 100 µl (piastra da 24 pozzetti) o 500 µl (piastra da 6 pozzetti) di terreno da ciascun pozzetto contenente le cellule da trasfettare.

Centrifugare brevemente la provette ed aggiungere, goccia a goccia, i complessi oligonucleotide-Lipofectamine al pozzetto.

Incubare le cellule in incubatore a 37°C, 5% CO₂.

Dopo 6h sostituire il terreno alle cellule trasfettate con terreno di coltura contenente antibiotici e re-incubare a 37°C, 5% CO₂.

2.6 Preparazione di estratti proteici da linee cellulari e tessuti

Buffer di lisi

Tris-HCl (pH 7.6)	0.01 M
NaCl	0.1 M
EDTA (pH 8.0)	0.01 M
Triton X-100	0.1%
DTT	1 mM
PMSF	1 mM
Orto-fosfo-vanadato	1 mM
Mix inibitori (Roche)	1X

NB: aggiungere DTT, PMSF, orto-fosfo-vanadato e mix di inibitori solo immediatamente prima dell'uso.

Procedura:

- Linee cellulari

Aggiungere a ciasun pellet cellulare, mantenuto in ghiaccio secco per evitare lo scongelamento, 25 µl di Buffer di lisi freddo, risospendere i pellet vortexando per 10'' e lasciare in ghiaccio per 30'.

Centrifugare a 13000 rpm per 15' a 4°C.

Prelevare il sovrantante e trasferirlo in una nuova provetta.

Quantificare i campioni tramite saggio di Lowry (Paragrafo 2.7).

Conservare i campioni a -20°C.

- Tessuti

Posizionare il pezzo chirurgico su di una piastra Petri di vetro appoggiata su di un blocco di ghiaccio secco.

Polverizzare il tessuto con un bisturi fino a riempire mezza provetta da 1.5 ml.

Aggiungere al tessuto ploverizzato 100 µl di Buffer di lisi e procedere come sopra descritto.

2.7 Dosaggio di estratti proteici tramite Lowry assay (Kit Biorad)

Materiali:

DC Protein Assay (Biorad)

BSA (Sigma)

Cuvette di plastica

Procedura:

Risospendere 1.5 mg di BSA in 1 ml di acqua bi-distillata sterile (BDW) e fare le seguenti diluizioni in BDW (20 µl):

- 1,5 mg/ml

- 0,75 mg/ml

- 0,15 mg/ml

Queste diluizioni rappresentano gli standard proteici a concentrazione nota.

Diluire ciascun campione 1:10 in BDW, volume finale 20 µl.

Preparare per ciascun campione 100 µl di soluzione A+S: 98 µl Buffer A + 2 µl Buffer S.

Addizionare 100 µl della soluzione A+S ad ogni standard e campione.

Vortexare per 10''.

Aggiungere 800 µl di Soluzione B.

Miscelare per inversione ed incubare a RT per 15'.

Leggere l'assorbanza a 500 nm.

2.8 Western blot

Materiali:

30% Acrylamide/Bis Solution (29:1) (Biorad)

2-mercapto-etanolo (Biorad)

TEMED (Biorad)

Ammonium Persulfate (APS) (Biorad)

Bromofenolblu (Biorad)

Hybond ECL-Nitrocellulosa (Amersham)

Rosso Ponceau (Sigma)

Latte in polvere (Nestlè)

Hyperfilm ECL (Amersham)

Developer Solution (5X) (Kodak)

Fixing Solution (5X) (Kodak)

ECL Advance Western Blotting Detection Kit (Amersham)

Anticorpi (vedi Tabella 3)

Tabella 3. Anticorpi primari e diluizioni utilizzate.

Tipo	Diluizione Ab primario	Diluizione Ab secondario	Produttore
mAb anti-Cyclin G1 (F-5)	1:100	1:10000	SantaCruz Biotecnology
mAb anti-p53 (DO-7)	1:1000	1:10000	DakoCytomation
mAb anti-p21 (F-5)	1:100	1:7500	SantaCruz Biotecnology
mAb anti- β -actin	1:1000	1:10000	SantaCruz Biotecnology
Ab anti-cleaved caspase-3	1:1000	1:7500	Cell Signaling
Ab anti-Puma	1:1000	1:7000	Cell Signaling
Ab anti-PPP2R5B	1:200	1:7500	ABR
Ab anti-p57 (C-20)	1:500	1:10000	SantaCruz Biotecnology
mAb anti-p27 (57)	1:1000	1:10000	BD Biosciences
Ab anti-Bmf	1:200	1:10000	Novus Biologicals
Ab anti-mTOR	1:1000	1:7500	Cell Signaling
Ab anti-c-Met	1:1000	1:7500	Cell Signaling
Ab anti-phospho-S6 (Ser-240/244)	1:1000	1:10000	Cell Signaling

RESOLVING GEL

Per un volume finale di 7 ml, vedi Tabella 4.

Tabella 4. Resolving gel a diversa percentuale di Acrilamide.

% Acrilamide	8%	10%	12%	14%
Componente				
H2O (ml)	3.22	2.82	2.35	1.88
30% Acrilamide/Bis (ml)	1.87	2.33	2.80	3.27
Tris-HCl, pH 8.8, 1.5 M (ml)	1.75	1.75	1.75	1.75
SDS 10% (µl)	70	70	70	70
TEMED (µl)	35	35	35	35
APS 10% (µl)	3.5	3.5	3.5	3.5

STACKING GEL

Per un volume finale di 5 ml:

H2O	3.0 ml
Acrilammide:Bisacrilammide	665 µl
Tris-HCl, pH 6.8, 0.5M	1.25 ml
SDS 10%	50 µl
TEMED	5.0 µl
APS 10%	100 µl

RUNNING BUFFER 1X

TRIZMA-Base	3.0 g
Glicina	15.0 g
SDS 10%	10 ml

Portare ad 1 L con BDW.

TRANSFER BUFFER 1X

TRIZMA-Base	3.0 g
Glicina	15.0 g
Metanolo	20%

Portare ad 1 L con BDW.

LAEMMLI BUFFER 2X

Tris-HCl	0.1 M
SDS	4.0%
Bromofenolblu	0.2%
Glicerolo	20%
2-mercapto-etanolo	5.0%

Portare a pH 6.8 con HCl 1 M e portare a volume (10 ml) con BDW.

Fare aliquote monouso da 100 µl e conservare a -20°C.

TBS

Tris-HCl (0.5 M)	7.88 g
NaCl (1.5 M)	8.77 g

Portare a pH 7.5 con NaOH 1 M e portare ad 1 L con BDW.

Procedura:

Prelevare un volume di estratto proteico pari a 50 µg.

Aggiungere un ugual volume di Laemmli buffer 2X.

Bollire i campioni per 10'.

Caricare i campioni ed il marker di pesi molecolari sul gel di poliacrilammide utilizzando puntali a capillare.

Effettuare la corsa elettroforetica in Running Buffer 1X a 15 mA per 3h a RT.

Equilibrare il gel per 1' in Transfer Buffer 1X.

Lavare la membrana di nitrocellulosa per 5' in BDW ed equilibrarla per 1' in Transfer Buffer 1X.

Montare l'apparato di trasferimento ed effettuare il trasferimento su membrana in Transfer Buffer 1X a 250 mA per 2.5h a 4°C.

Smontare l'apparato e colorare la membrana con rosso Ponceau per verificare l'avvento trasferimento delle proteine.

Decolorare la membrana in PBS.

Lavare la membrana in TBS più Tween 20 allo 0.1% (TBS-T)

Bloccare la membrana in 5% (w/v) latte in polvere in TBS-T per 1h a RT in leggera agitazione.

Lavare la membrana per 1' in TBS-T.

Incubare la membrana overnight a 4°C in agitazione con l'anticorpo primario diluito in TBS-T (Vedi Tabella 3).

Fare 3 lavaggi della membrana in TBS-T per 10' a RT in agitazione.

Incubare la membrana per 1h a RT in agitazione con l'anticorpo secondario diluito in TBS-T (Vedi Tabella 3).

Rivelare con ECL Advance Western Blotting Detection Kit.

In camera oscura aggiungere una lastre fotografica e, dopo il tempo di impressionamento ottimale per ciascun anticorpo primario, procedere con lo sviluppo della lastra fotografica.

Acquisire l'immagine digitale delle lastre tramite Fluor-S MultiImager (Biorad) e quantificare le bande tramite il software densitometrico Quantity-one (Biorad).

2.9 Estrazione di RNA da linee cellulari e tessuti

Materiali:

Trizol (Invitrogen)

Cloroformio (Carlo Erba)

Isopropanolo (Carlo Erba)

Di-ethyl-pyro-carbonate (DEPC) (Sigma)

Etanolo assoluto (Carlo Erba)

Procedura:

Aggiungere a ciascun pellet cellulare, mantenuto in ghiaccio secco per evitare lo scongelamento, 700 µl di Trizol.

Risospendere il pellet con una siringa da 2.5 ml ed incubare a RT per 10'.

Aggiungere 140 µl di Cloroformio, miscelare vigorosamente per inversione; incubare per 3' a RT.

Centrifugare i campioni a 12500 rpm per 15' a 4°C.

Prelevare la fase acquosa facendo attenzione a non toccare l'anello bianco di DNA e riporre il sovrnatante in una nuova provetta.

Aggiungere 350 µl di Isopropanolo e miscelare delicatamente per inversione (4-6 volte); incubare a RT per 10'.

Centrifugare a 12500 rpm per 10' a 4°C.

Eliminare sovrantante facendo attenzione a non disturbare il pellet; asciugare i bordi della provetta con carta assorbente.

Fare un lavaggio del pellet con 700 µl di Etanolo al 70% in acqua DEPC.

Centrifugare i campioni a 7500 rpm per 5' a 4°C.

Eliminare il sovrantante facendo attenzione a non disturbare il pellet; asciugare i bordi della provetta con carta assorbente.

Lasciare asciugare il pellet a RT e successivamente risospenderlo in un adeguato volume di H₂O DEPC (10-30 µl).

Quantificare la concentrazione di RNA estratto mediante lettura spettrofotometrica utilizzando lo strumento NanoDrop ND-420 (Celbio) e il software NanoDrop (versione 3.0.0).

NB: Per l'estrazione dell'RNA da tessuto, polverizzare il campione come descritto nel Paragrafo 2.6. Aggiungere 700 µl di Trizol e procedere come sopra descritto.

2.10 Real time PCR

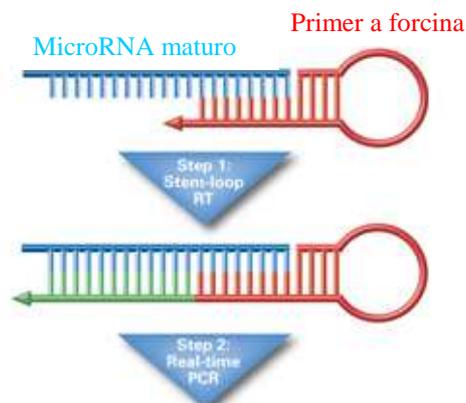
La quantificazione di microRNA maturi tramite analisi di Real Time PCR viene eseguita usando il kit 'TaqMan MicroRNA Assay' e prevede due passaggi principali:

Step 1. Trascrizione inversa (RT). Il filamento di cDNA viene inversamente trascritto a partire da un campione di RNA totale usando un primer miRNA-specifico con struttura a forcina presente nel kit TaqMan MicroRNA Assay e utilizzando i reagenti provenienti dal kit 'TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription'. L'utilizzo di questo primer miRNA-specifico consente di retrotrascrivere solo il microRNA maturo e non i suoi precursori, i quali possiedono una complessa struttura secondaria.

Step 2. Real time PCR. I campioni di cDNA vengono successivamente amplificati utilizzando il secondo reagente del kit ‘TaqMan MicroRNA Assay’, contenente una sonda TaqMan e i primer Forward e Reverse miRNA-specifici, insieme al reagente ‘TaqMan® Universal PCR Master Mix’.

I due step sono schematizzati in Figura 7.

Step 1



Step 2

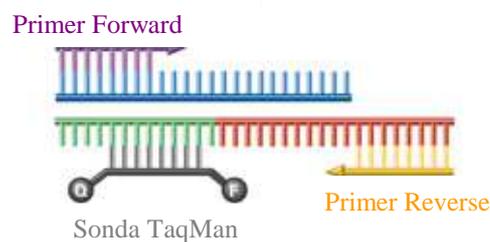


Figura. 7: Procedura di Real time PCR con kit ‘TaqMan MicroRNA Assay’.

Procedura:

- Step 1

In una provetta da 0.2 ml aggiungere un volume pari a 50 ng di RNA.

Portare i campioni ad un volume di 5 µl con H₂O DEPC.

Preparare la mix per la retro-trascrizione utilizzando i reagenti del kit ‘TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription’ ed il Primer 5X contenuto nel kit ‘TaqMan MicroRNA Assay’, come indicato in Tabella 5.

Tabella 5. Mix di retro-trascrizione (1 campione).

Componenti	Volume (µl)
H2O DEPC	4.16
10X Reverse Transcription Buffer	1.5
100nM dNTPs	0.15
Rnase Inhibitor	0.19
MultiScribe reverse transcriptase	1.0
Primer 5X	3.0

Aggiungere 10 µl di mix di retrotrascrizione a ciascun campione di RNA.

Incubare in ghiaccio per 5'.

Posizionare i campioni nel Thermal Cycler 'GeneAmp PCR system 9700' (Applied Biosystems) ed eseguire il programma di retrotrascrizione come riportato in Tabella 6.

Tabella 6. Termociclo per la retrotrascrizione con TaqMan microRNA assay.

Step	Tempo (min)	Temp (°C)
1	30	16
2	30	42
3	5	85
4	∞	4

- Step 2

Strumento: iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System (Biorad)

Terminata la reazione di retro-trascrizione, porre i campioni di cDNA in ghiaccio e preparare la mix per la reazione di Real Time PCR come indicato in Tabella 7.

Analizzare ogni campione in triplicato.

Tabella 7. Composizione mix di Real time PCR con 'TaqMan microRNA assay' (1 campione).

Componenti	Volume (µl)
H2O DEPC	7.67
TaqMan 2X Universal PCR master mix	10.0
TaqMan MicroRNA Assay Probe 20X	1.0

NB: Ricoprire il tubo contenente la sonda TaqMan con carta stagnola e tenere al buio.

Aggiungere 18.67 µl della master mix in ogni pozzetto della piastra.

Aggiungere 1.33 µl di cDNA a ciascun pozzetto.

Coprire la piastra con il coperchio adesivo e centrifugarla brevemente (2000 rpm, 30’’).

Impostare lo schema corrispondente alla piastra di reazione tramite il software iCycler iQ Detection System Versione 3.0 (Biorad).

Impostare il programma di amplificazione come riportato in Tabella 8.

Tabella 8. Termociclo di Real time PCR con ‘TaqMan microRNA assay’.

Step	Attivazione dell’enzima ampliTaq gold	Real Time PCR	
		Cicli (N=40)	
		Denaturazione	Annealing/Estensione
Tempo (sec)	600	15	60
Temperatura (°C)	95	95	60

Posizionare la piastra nella macchina di Real Time PCR e far partire la corsa.

Analizzare i dati su foglio Excel tramite metodo del $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, utilizzando come gene housekeeping la subunità ribosomale, U6RNA.

2.11 Trascrizione inversa

Questa procedura consente di sintetizzare cDNA a singolo filamento a partire da un campione di RNA totale.

Strumento: GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems)

Kit: ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega)

Procedura:

In una provetta da 0.2 ml aggiungere un volume pari ad 1 µg di RNA e portare il campione ad un volume di 5 µl con H₂O DEPC.

Aggiungere ad ogni campione 1 µl della seguente mix di reazione:

PRIMER MIX (1 campione)

Oligo-dT Primer	0.5 µl
Random Primers	0.5 µl

Incubare a 70°C per 5'.

Raffreddare a 4°C per 5'.

Aggiungere ad ogni campione 15 µl della mix di retrotrascrizione (Tabella 9).

Tabella 9. Composizione mix di retro-trascrizione (1 campione).

Componenti	Volume (µl)	Conc. finale
H ₂ O DEPC	6.6	
Improm-II 5X Buffer	4.0	
MgCl ₂ (25 mM)	2.4	3.0 mM
dNTPs mix (10mM)	1.0	0.5 mM
RNasin Inhibitor	0.5	
Improm-II RT	0.5	

Posizionare i campioni nel Thermal Cycler ed eseguire il programma di retrotrascrizione come riportato in Tabella 10.

Tabella 10. Termociclo di retrotrascrizione.

Step	Tempo (min)	Temp (°C)
1	5	25
2	60	42
3	15	70
4	∞	4

Conservare i campioni di cDNA a -20°C.

2.12 PCR semi-quantitativa

La PCR è stata utilizzata per analizzare variazioni dell'espressione genica di mRNA di interesse in seguito a specifici trattamenti cellulari o nei campioni di tessuto provenienti da HCC. Tutte le PCR sono state condotte in un range lineare di amplificazione, consentendo un'analisi semi-quantitativa dell'espressione genica. La β -actina è stata utilizzata come gene housekeeping per la normalizzazione dei campioni. L'intensità delle bande è stata misurata utilizzando il Software Quantity-One (Biorad).

Le coppie di primer utilizzate e le condizioni di PCR sono riportate in Tabella 11.

Tabella 11. Coppie di primers utilizzate. Nella tabella sono riportate le sequenze dei primer utilizzati con le corrispondenti lunghezze (L) dell'amplificato, temperature di annealing (Ta) e numero di cicli (N) di amplificazione.

Gene	Sequenza Primer	Amp (bp) (L)	Ta (C°)	Cicli (N)
Cyclin G1	Fw 5'-AATGAAGGTACAGCCCAAGCA-3' Rv 5'-GCTTTGACTTTCCAACACACC-3'	195	63	27
Puma	Fw 5'-TCCTCAGCCCTCGTCTC-3' Rv 5'-TTGTCTCCGCCGGCTCGTA-3'	197	61	31
Bax	Fw 5'-TGCTTCAGGGTTTCATCCAG-3' Rv 5'-TCATCCTCTGCAGCTCCATG-3'	162	61	31
E-caderina	Fw 5'-TCCTGGGCAGAGTGAATTTTGA-3' Rv 5'-GCGTGAGAGAAGAGAGTGTATGTGG-3'	550	56	29
p57	Fw 5'-GGCCTCTGATCTCCGATTTCT-3' Rv 5'- -CACTTTGGGACCAGTGTACCTTCT-3'	375	63	28
p27	Fw 5'-TAACCCGGGACTTGGAGAAG-3' Rv 5'-GCTTCTTGGGCGTCTGCTC-3'	449	62	30
Bmf	Fw 5'-ATGGAGCCATCTCAGTGTGTG-3' Rv 5'-CCCCGTTCTGTCTCTTCT-3'	540	56.5	30
mTOR	Fw 5'-ACATGCAGCTGTCCTGGTTC-3' Rv 5'-TGAGGCTTCTGCATCTCCTT-3'	201	61	29
c-Met	Fw 5'-AGGGCAGTGCAGCATGTAGT -3' Rv 5'-GATGATCCCTCGGTCAGAA-3'	200	61	29
p21	Fw 5'-AAGACCATGTGGACCTGTCA-3' Rv 5'-GGCTTCTCTTGGAGAAGAT-3'	174	55	30
β-actin	Fw 5'-CAAGAATGGCCACGGCTGCT-3' Rv 5'-TCCTTCTGCATCCTGTCCGCA-3'	275	55	25

Aggiungere in provette da 0.2 ml 24 μ l della mix di PCR (Tabella 12) ed 1 μ l di cDNA.

Tabella 12. Composizione mix di PCR (1 campione).

Componenti	Volume (μl)	Concentrazione finale
H2O DEPC	15.0	
Gold Buffer (10X)	2.5	1X
MgCl ₂ (25 mM)	2.5	2.5 mM
dNTPs mix (2.5 mM)	1.75	0.175 mM
Primer F	1.0	400 nM
Primer R	1.0	400 nM
Taq Gold (Applied Biosystems)	0.25	
cDNA	1.0	

Posizionare le provette da 0.2 ml nel Thermal Cycler GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems) ed impostare il termociclo utilizzando le temperature di annealing (Ta) ed il numero di cicli (N) riportati in Tabella 11.

Termociclo:

1. 95°C 10' attivazione Taq Gold
2. 95°C 30'' denaturazione
3. Ta°C 30'' annealing
4. 72°C 30''-1.0' elongazione
5. Step 2 per N volte
6. 72°C 7' elongazione finale
7. 4°C for ever
8. end

Il prodotto amplificato è stato sottoposto a corsa elettroforetica in gel di Agarosio al 2.0% con Etidio Bromuro allo 0.01%. La corsa è stata eseguita in TBE 1X (Sigma) a 120V per 45'.

Le immagini digitali delle bande sono state acquisite con Fluor-S MultiImager e l'analisi quantitativa del segnale è stata condotta con il software Quantity-one (Biorad).

2.13 Clonaggi

In questo lavoro di tesi è stata utilizzata la tecnica del clonaggio per l'inserimento di regioni 3'UTR a valle del gene reporter contenuto all'interno del plasmide pGL3 Control Vector. L'inserimento dei siti di restrizione ad entrambe le estremità della regione 3'UTR è stato ottenuto tramite amplificazione del frammento con primer specifici contenenti all'estremità 5' i sei nucleotidi corrispondenti alla sequenza consensus dell'enzima XbaI. I primer utilizzati sono riportati in Tabella 13. Il frammento amplificato tramite PCR è stato ligato all'interno del vettore TA-cloning, pGEM-T Easy Vector, la cui mappa è riportata in Figura 8. Il vettore pGEM ricombinante è stato sottoposto a digestione enzimatica con XbaI ed il frammento purificato da gel di Agarosio. Il frammento corrispondente alla regione 3'UTR è stato successivamente clonato all'interno del vettore pGL3 Control Vector, utilizzando il sito unico di restrizione XbaI. La mappa di pGL3 Control Vector è riportata in Figura 9. Il costrutto plasmidico così ottenuto è stato utilizzato per l'esecuzione del saggio di Luciferasi (Paragrafo 2.14).

Materiali:

- **Enzimi di restrizione**

Tipo	Produttore
XbaI	Invitrogen
EcoRI	Invitrogen

- **Enzimi vari**

Tipo	Produttore
AmpliTaq Gold	Applied Biosystems
Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP) 20 U/ μ l	Invitrogen
T4 DNA ligase 3U/ μ l	Promega

- **Plasmidi**

Tipo	Produttore
pGEM	Promega
pGL3	Promega

- **Farmaci**

Tipo	Produttore
Ampicillina	Sigma

- **Tipi cellulari**

Tipo	Produttore
JM109 batteri competenti	Promega

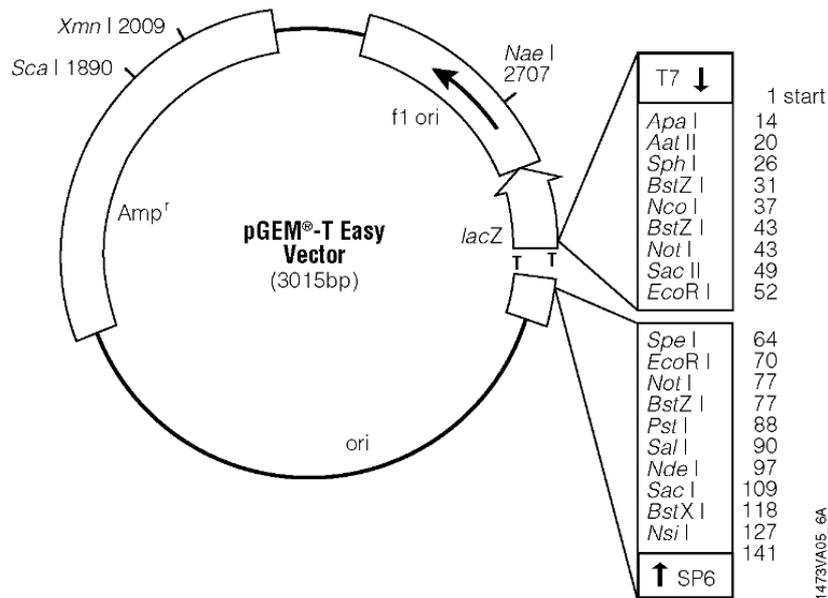


Figura 8: Mappa del plasmide pGEM-T Easy Vector. Il plasmide contiene due CDS (Amp^r : che codifica per l'enzima β -lattamasi; $lacZ$: che codifica per l'enzima β -galattosidasi), un'origine di replicazione di origine fagica (f1 ori), un'origine (ori) per la replicazione in *E. coli*. Il plasmide è stato linearizzato con l'enzima di restrizione *EcoRV* alla base 60 e le basi T sono state aggiunte a ciascuna estremità 3'.

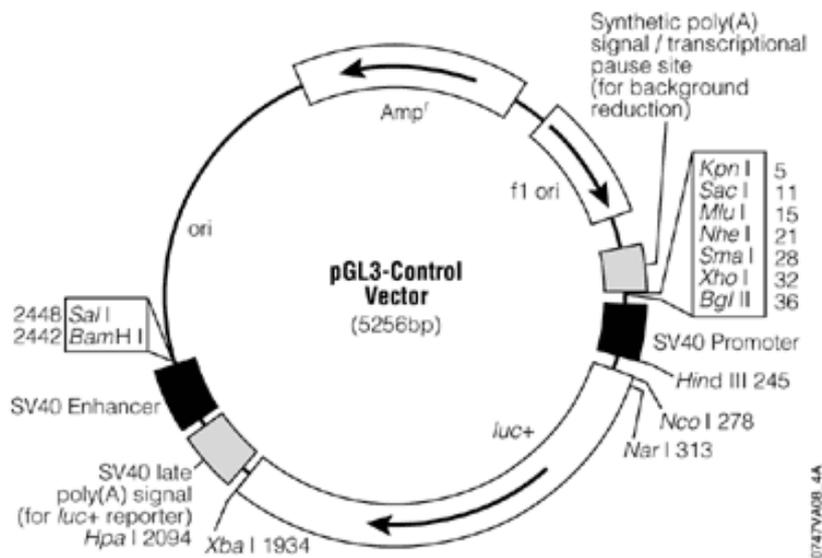


Figura 9. Mappa del plasmide pGL3 Control Vector. Il plasmide contiene 2 CDS (Amp^r : che codifica per l'enzima β -lattamasi; $luc+$: che codifica per la luciferasi di Lucciola), un'origine di replicazione di origine fagica (f1 ori), un'origine (ori) per la replicazione in *E. coli*.

- Terreni di coltura

LB liquido (1 L) :

- LB broth base (Invirogen) 20.0 g
- Portare a volume con BDW

LB Agar (1 L) :

- LB Agar (Invirogen) 32.0 g
- Portare a volume con BDW

SOC (1 L) :

- Tryptone (Sigma) 20 g
- Yest Extract (Sigma) 5 g
- NaCl (Sigma) 0.5 g
- Sciogliere in 950 mL H₂O
- Glucosio (Sigma) 20mM
- Aggiungere 10 mL di soluzione KCl (Carlo Erba) 250 mM
- Portare a pH 7.0 con NaOH (Carlo Erba) 5N
- Portare a volume con BDW

- Gel d'agarosio
 - Agarose (Amresco) da 0.8% a 2.0%
 - TAE 1X

TAE 5X (1 L):

- Tris Base (Sigma) 242 g
- Acido Acetico Glaciale (Sigma) 57.1 mL
- EDTA (Sigma) pH 8, 0.5M, 100ml
- Portare a volume con BDW

Marker

Bench Top 100 bp DNA ladder (Promega)

Metodi:

Tabella 13. Coppie di primer utilizzate per l'amplificazione di regioni 3'UTR di Ciclina G1, CDKN1C/p57, Bmf, mTOR. Nella tabella sono riportate le sequenze dei primer utilizzati nelle PCR con le corrispondenti lunghezze (L) dell'amplificato, temperature di annealing (Ta) e numero di cicli (N) di amplificazione.

Regione da clonare	Sequenze Primer	L (bp)	Ta (C°)	Cicli (N)
Ciclina G1 3'UTR	Fw 5'-TTTCTAGAAAACAGGTGACATTTGTATC-3' Rv 5'-TTGTCTAGATTACCTCTGCCAAC-3'	744	58	35
CDKN1C/p57 3'UTR	Fw 5'-TCTAGAGCCCAAAGAGCCC-3' Rv 5'-TCTAGAGATTAAACATTTTATATAAAATGAC-3'	295	56	35
Bmf 3'UTR	Fw 5'-TTTCTAGAAGTTGGTCAACAGATCTG-3' Rv 5'-ATGTCTAGAACATAAACACATAAAGCC-3'	977	60	35
mTOR 3'UTR	Fw 5'-CTTTCTAGAAACTGGAGGCCAG-3' Rv 5'-TGGTGTCTAGACATGGCTACACTTTATAC-3'	908	58	35

Mix di PCR, vedi Tabella 12.

Termociclo:

1. 95°C 10' attivazione AmpliTaq Gold
2. 95°C 30'' denaturazione
3. Ta°C 30'' annealing
4. 72°C 1.0' elongazione
5. step 2 per 34 volte
6. 72°C 7' elongazione finale
7. 4°C for ever
8. end

- **Protocollo di ligasi**

Tabella 14. Composizione mix di ligasi (1 campione).

Componenti	Volume (µl)
H2O DEPC	2 µl
Buffer 2X	5.0
pGEM/pGL3 vector (50 ng/µl)	1.0
DNA *	1.0
T4 DNA ligase	1.0

*Prodotto di PCR per la ligasi in pGEM vector.

*DNA eluito da gel di agarosio per la ligasi in pGL3 vector.

Incubare la mix di ligasi 1h a RT.

- **Protocollo di trasformazione batterica**

- Trasferire in una provetta da 15 ml con fondo tondeggiante 100 µl di batteri competenti JM109 e mantenere in ghiaccio.
- Aggiungere ai batteri 2 µl di mix di ligasi.
- Incubare 20' in ghiaccio.
- Incubare 1' a 42°C.
- Incubare 2' in ghiaccio.
- Aggiungere 900 µl di SOC freddo.
- Incubare 1.5h a 37°C, 225 rpm.
- Piastrare separatamente 100 µl e 900 µl di sospensione batterica in piastre contenenti LB Agar + Ampicillina 100 µg/ml.
- Incubare a 37°C per 16h.

- **Protocollo per mini prep**

Buffer P1 :

- Tris-HCl pH 8 50 mM
 - EDTA 10 mM
 - RNase A 100 µg/ml
- NB: aggiungere RNase A al momento dell'uso.

Buffer P2 :

- NaOH 200 mM
- SDS 1%

Buffer P3 :

- Potassio acetato 3.0 M
- Portare a pH 5.5

Buffer TE :

- Tris-HCl, pH 8.0 10 mM
- EDTA 1.0 mM

- Inoculare una singola colonia in 2 ml di LB + Ampicillina 100 µg/ml.
- Incubare a 37°C, 225 rpm, per 16h.
- Trasferire 1.0 ml della coltura batterica in una provetta da 1.5 ml, conservare il restante 1 ml di coltura a + 4°C.
- Centrifugare la coltura batterica a 13000 rpm per 2'.

- Eliminare il sovrnatante.
- Risospendere il pellet batterico in 100 µl di Buffer P1 freddo, a cui è stata aggiunta RNase A 100 µg/ml.
- Risospendere il pellet vortexando.
- Aggiungere 200 µl di Buffer P2.
- Risospendere per inversione, incubare 5' a RT.
- Aggiungere 165 µl di Buffer P3 freddo.
- Risospendere per inversione.
- Centrifugare a 13000 rpm per 8'.
- Trasferire il sovrnatante in una provetta da 1.5 ml.
- Aggiungere 450 µl di isopropanolo.
- Risospendere per inversione.
- Centrifugare a 13000 rpm per 8'.
- Eliminare il sovrnatante.
- Fare un lavaggio con 500 µl di etanolo al 70%.
- Centrifugare a 13000 rpm per 5'.
- Eliminare il sovrnatante.
- Asciugare il pellet per 10' a RT.
- Risospendere il pellet in 20 µl di Buffer TE.
- Digerire i DNA plasmidici con gli enzimi di restrizione per verificare la presenza dell'inserto.

- **Protocolli di digestione enzimatica**

Dopo miniprep

Enzimi XbaI/EcoRI

Componenti	Volume (µl)
H2O DEPC	14.5
Buffer 10X	2.0
DNA plasmidico	3.0
Enzima di restrizione	0.5

Incubare 2h a 37°C.

Analizzare le digestioni dei DNA plasmidici tramite corsa elettroforetica su gel di Agarosio in TAE, 0.01% Etidio-Bromuro, a 120V per 45'.

Selezionare il clone batterico contenente l'inserto, amplificarlo e purificare il DNA plasmidico tramite maxi prep.

- **Protocollo per maxi prep Qiagen**

- Inoculare 100 µl della sospensione batterica del clone selezionato in 200 ml di LB + Ampicillina 100 µg/ml.
- Incubare 16 h a 37°C, 225 rpm.
- Centrifugare la sospensione batterica a 4000 rpm per 15' a + 4°C.
- Eliminare il sovrnatante.
- Risospendere il pellet batterico in 10 ml di Buffer P1 freddo, a cui è stata aggiunta RNase A 100 µg/ml.
- Risospendere il pellet vortexando.
- Aggiungere 10 ml di Buffer P2.
- Risospendere per inversione, incubare 5' a RT.
- Aggiungere 10 ml di Buffer P3 freddo.
- Risospendere per inversione, incubare in ghiaccio per 20'.
- Centrifugare a 12000 rpm per 30'.
- Trasferire il sovrnatante in un nuovo tubo.
- Centrifugare a 12000 rpm per 15'.
- Equilibrare una colonna QIAGEN-tip 500 con 10 ml di Buffer QBT.
- Aggiungere il sovrnatante alla colonna e lasciare entrare nella resina per gravità.
- Fare 2 lavaggi con 30 ml di Buffer QC.
- Fluire con 15 ml di Buffer QF.
- Precipitare il DNA plasmidico aggiungendo 10.5 ml di isopropanolo.
- Mischiare per inversione e centrifugare a 8000 rpm per 15'.
- Eliminare il sovrnatante.
- Fare un lavaggio con 5.0 ml di etanolo al 70%.
- Centrifugare a 8000 rpm per 10'.
- Eliminare il sovrnatante.
- Asciugare il pellet per 10 minuti a RT.
- Rispendere il pellet in 200 µl di TE.
- Conservare il DNA plasmidico a -20°C.

- **Protocolli di digestione enzimatica**

Dopo maxiprep

Enzima XbaI

Componenti	Volume (µl)
H2O DEPC	14.0
Buffer 10X	2.0
DNA plasmidico (1 µg/µl)	1.0
Enzima di restrizione	3.0

Incubare 2h a 37°C.

NB: Per la linearizzazione del plasmide pGL3 Control vector aggiungere 1 µl di CIAP ed incubare per altri 5' a 37°C.

Analizzare le digestioni dei DNA plasmidici tramite corsa elettroforetica su gel di Agarosio in TAE, 0.01% Etidio-Bromuro, a 120V per 45'.

Procedere all'eluizione dell'inserto da gel.

- **Eluizione di DNA da gel di agarosio**

Kit: Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

- Pesare una provetta da 1.5 ml con bilancia analitica.
- Visualizzare il DNA usando una lamapada UV a bassa lunghezza d'onda ed excidere la banda d'interesse con un bisturi monouso.
- Trasferire la il frammento di gel contenente il DNA nella provetta pre-pesata e ri-pesare la provetta. Fare la tara per calcolare il peso del gel.
- Aggiungere Membrane Binding Solution in un rapporto di 10 µl ogni 10 mg di gel di agarosio.
- Vortexare ed incubare a 50°C per 10' o fino che il gel è completamente sciolto.
- Trasferire la miscela contenente il gel disciolto in una SV Minicolumn posta in una provetta di raccolta.
- Centrifugare a 14000 rpm per 1' a RT.
- Eliminare il liquido di scarto.
- Fare un lavaggio con 700 µl Membrane Wash Solution.
- Centrifugare a 14000 rpm per 1' a RT.
- Eliminare il liquido di scarto.
- Ripetere il lavaggio con 500 µl Membrane Wash Solution.

- Centrifugare a 14000 rpm per 1' a RT.
- Eliminare il liquido di scarto.
- Trasferire la colonnina in una provetta da 1.5 ml.
- Aggiungere 30 µl di H₂O DEPC al centro della colonna.
- Incubare 1' a RT.
- Centrifugare a 14000 rpm per 1' a RT.
- Analizzare la qualità e la quantità del DNA eluito da gel tramite corsa elettroforetica su gel di Agarosio in TAE 1X, 0.01% Etidio-Bromuro, a 120V per 45'.
- Eseguire la ligasi del frammento eluito da gel in pGL3 vector linearizzato con l'enzima XbaI come indicato in Tabella 14. Procedere con i protocolli di trasformazione batterica, mini prep come sopra descritto.

- **PCR di direzionalità in vettore pGL3**

Poiché il frammento 3'UTR viene clonato nel vettore pGL3 utilizzando un unico sito di restrizione, XbaI, per la scelta del vettore ricombinante con il frammento inserito in direzione 5'→3' è necessario sottoporre i DNA plasmidici estratti tramite mini prep a 2 PCR di direzionalità. Per l'esecuzione delle PCR di direzionalità il primer Forward utilizzato per il clonaggio della regione 3'UTR è stato accoppiato con il primer Reverse che riconosce la sequenza del plasmide pGL3 Control Vector in prossimità del sito di restrizione XbaI (**Tabella 15**), e viceversa. Solo i cloni in cui il frammento 3'UTR si è inserito in direzione 5'→3' daranno luogo ad un amplificato in entrambe le PCR di direzionalità. La lunghezza dell'amplificato dipenderà dalla lunghezza della regione clonata in pGL3 vector.

Tabella 15. Coppia di primer per il plasmide pGL3 Control Vector. Nella tabella sono riportate le sequenze dei primer con la corrispondente lunghezza (L) dell'amplificato, temperatura di annealing (Ta) e numero di cicli (N) di amplificazione.

Vettore	Sequenze Primer	L (bp)	Ta (C°)	Cicli (N)
pGL3 Control Vector	Fw 5'-AGGAGTTGTGTTTGTGGACGAAGTACCG-3' Rv 5'-TCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCC-3'	199	60	35

Mix di PCR, vedi Tabella 12.

Termociclo:

1. 95°C 10' attivazione AmpliTaq Gold
2. 95°C 30'' denaturazione
3. 60°C 30'' annealing
4. 72°C 1.0' elongazione
5. step 2 per 34 volte
6. 72°C 7' elongazione finale
7. 4°C for ever
8. end

Analizzare gli amplificati tramite corsa elettroforetica su gel di Agarosio in TAE 1X, 0.01% Etidio-Bromuro, a 120V per 45'.

Scegliere il clone con il frammento inserito in direzione 5'->3' e procedere all'amplificazione ed alla purificazione del vettore tramite maxi prep, come sopra descritto.

2.14 Saggio di luciferasi

Kit: Dual Luciferase Assay (Promega)

Strumento: Luminometro GLOMAX (Promega)

Passive Lysis Buffer

Aggiungere un volume di Passive Lysis Buffer (5X) a 4 volumi di BDW. Preparare fresco.

Luciferase Assay Reagent II (LAR II)

Risospendere il liofilizzato Luciferase Assay Substrate in 10 ml di Luciferase Assay Buffer II. Fare aliquote da 650 µl e conservare a -80°C.

Stop&Glo Reagent

Aggiungere un volume di Stop&Glo Substrate (50X) a 50 volumi di Stop&Glo Buffer. Preparare fresco.

Procedura:

Dopo 24h dalla trasfezione cellulare (Paragrafo 2.5), eliminare il sovrnatante da ciascun pozzetto (piastra da 24 pozzetti).

Fare un lavaggio con 500 µl di PBS.

Aggiungere 100 µl di Passive Lysis Buffer a ciascun pozzetto.

Incubare per 15' a temperatura ambiente in leggera agitazione.

Raccogliere i lisati cellulari in provette da 1.5 ml e mantenere in ghiaccio.

Accendere il luminometro ed impostare il seguente programma:

- Periodo di ritardo pre-misura del campione: 2''
- Periodo di misura del campione: 10''

Aggiungere 100 µl di LAR II a ciascun tubo da 1.5 ml.

Aggiungere 20 µl di campione al primo tubo ed effettuare la lettura.

Trascrivere il valore fornito dal luminometro.

Aggiungere 100 µl di Stop&Glo Reagent, vortexare il campione ed effettuare la seconda lettura.

Trascrivere il valore fornito dal luminometro.

Eseguire la lettura di tutti i campioni procedendo come sopra.

2.15 Citofluorimetria a flusso

Strumento: FACSAria cell sorter (BD Biosciences)

- Analisi del ciclo cellulare con Propidio Ioduro (PI)

Materiali:

Propidio Iodide Solution 1.0 mg/ml (Sigma)

RNase A (Sigma)

Etanolo assoluto (Carlo Erba)

Procedura:

Tripsinizzare le cellule e raccoglierle in una provetta da 15 ml.

Centrifugare a 1200 rpm per 5' a RT.

Eliminare il sovrnatante e fare un lavaggio con 1 ml di PBS.

Risospendere le cellule in 1 ml di PBS.

Aggiungere goccia a goccia 2.5 ml di etanolo assoluto freddo, vortexando il campione durante l'aggiunta per non far precipitare le cellule.

Fissare le cellule per 16h a -20°C .

Centrifugare a 1200 rpm per 5' a RT.

Fare un lavaggio in PBS.

Risospendere le cellule in 500 μl di PBS contenenti 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di RNase A e 5 μl di PI.

Incubare per 30' a RT al buio.

Centrifugare a 1200 rpm per 5' a RT.

Risospendere in 500 μl di PBS.

Leggere al FACS.

- Analisi dell'apoptosi

Kit: Annexin V/Propidium Iodide detection kit (Bender MedSystems).

Procedura:

Tripsinizzare le cellule e raccoglierle in una provetta da 15 ml.

Centrifugare a 1200 rpm per 5' a RT.

Eliminare il sovrnatante e fare un lavaggio con 1 ml di PBS.

Risospendere le cellule in 1 ml di PBS.

Contare le cellule con camera di Bunker.

Risospendere le cellule in PBS ad una concentrazione di 500000 cellule/ml.

Prelevare 195 μl di sospensione cellulare e trasferirle in una provetta da 1.5 ml.

Aggiungere 5.0 μl di anticorpo anti-Anexina marcato con FITC.

Incubare in theromixer per 1h a 22°C , 400rpm.

Centrifugare 5' a 1500 rpm, RT.

Eliminare il sovrnatante.

Risospendere il pellet in 190 µl di Binding Buffer (1X) + 10 µl di PI.
Analizzare al FACS.

2.16 Saggio di invasione cellulare

Materiali:

ECM gel (Matrigel) (Sigma)
Boyden blind-well chambers (New Technologies Group)
Poly-vinyl-pyrrolidone free polycarbonate filters (Neuro Probe)
Etanolo assoluto (Carlo Erba)
Giemsa Solution (Sigma)

Procedura:

Disporre i filtri con la parte opaca rivolta verso l'alto in una piastra Petri.
Aggiungervi 50 µl di una soluzione acquosa di Matrigel (1.0 mg/ml) e lasciare asciugare.
Tripsinizzare le cellule e raccoglierle in una provetta da 15 ml.
Centrifugare a 1200 rpm per 5' a RT.
Eliminare il sovrnatante e fare un lavaggio con 1 ml di PBS.
Risospendere le cellule in 1 ml di terreno senza siero.
Contare le cellule con camera di Burker.
Risospendere le cellule in terreno senza siero ad una concentrazione di 30-50000 cellule/ml.
Prelevare 100 µl di sospensione cellulare e trasferirle in una provetta da 1.5 ml.
Aggiungere alla sospensione cellulare 100 µl di terreno senza siero.
Aggiungere 35 µl di terreno con 30% FBS nella parte inferiore della cameretta di Boyden e posizionare il filtro con la parte ricoperta dal Matrigel rivolta verso l'alto. Chiudere la cameretta di Boyden con l'apposito tappo a vite.
Aggiungere 200 µl della sospensione cellulare nella parte superiore della cameretta di Boyden.
Incubare per 24-48h in incubatore a 37°C, 5% CO₂.

Smontare le camerette di Boyden, recuperare il filtro e posizionarlo con la parte lucida rivolta verso l'alto su di un supporto di polistirolo, fissarlo con un ago da siringa.

Fissare le cellule con etanolo assoluto per 1' a RT.

Lavare i filtri con abbondante H₂O distillata.

Diluire 1:10 la soluzione di Giemsa in H₂O distillata e filtrare con filtro da 0.2 µm.

Ricoprire i filtri con la soluzione di Giemsa ed incubare 20' a RT.

Lavare i filtri con abbondante H₂O distillata.

Posizionare i filtri su di un vetrino porta-oggetti con la parte lucida, contenente le cellule che hanno migrato, rivolta verso il basso.

Lasciare asciugare i filtri per 15' a RT.

Pulire la parte opaca dei filtri, contenenti le cellule che non hanno invaso lo strato di matrice, con un cotton fioc.

Aggiungere una goccia di montante (DPX Mountant for hystology, Fluka) e posizionare un vetrino copri-oggetto sopra il filtro.

Osservare al microscopio e contare le cellule in 10 campi random ad un ingrandimento 25X.

CAPITOLO 3

RISULTATI

3.1 Individuazione di un pannello di microRNA deregolati nell'epatocarcinoma umano tramite analisi di microarray

Nell'ultimo decennio è stato ampiamente dimostrato il ruolo dei microRNA nello sviluppo e nella progressione tumorale (72). Analisi 'genome-wide' attraverso l'utilizzo di piattaforme microarray hanno evidenziato la presenza di firme molecolari di microRNA cancro-specifiche, in grado di differenziare i tessuti di natura tumorale dalle loro controparti di tipo normale (40).

Allo scopo di individuare un pannello di microRNA deregolati nel carcinoma epatocellulare, abbiamo eseguito un'analisi di microarray di miRNA su 17 tessuti di carcinoma epatocellulare (HCC) e 21 tessuti provenienti da fegato cirrotico (CE). Dal momento che, nei paesi occidentali, l'epatocarcinoma insorge nell'80% dei casi su di un fegato con cirrosi epatica cronca (73), abbiamo deciso di analizzare come gruppo di controllo campioni provenienti da fegato cirrotico e non da fegato sano, in quanto più rappresentativi della patologia. Le caratteristiche dei pazienti arruolati in questo studio sono elencate in **Tabella 16**.

Tabella 16. Caratteristiche di pazienti con epatocarcinoma arruolati per l'analisi di microarray, Northern blot e Real time PCR.

Genere	Maschio	45
	Femmina	15
Eziologia ¹	HCV	31
	HCV+BAb	6
	HBV+HCV	5
	HBV	5
	Etanolo	3
	HCV+Etanolo	2
Focalità ²	HBV+Etanolo	1
	Bab	1
	Criptogenica	6
	Unifocal	42
Dimensioni	Multifocal	18
	≤ 3 cm	16
Grado ³	> 3 cm	44
	G1	1
	G2	20
	G3	32
Alfa-feto proteina ⁴	G4	7
	≤ 20 ng/dL	26
	20-400 ng/dL	19
	> 400 ng/dL	15

1) HBV: Virus Epatite B; HCV: Virus Epatite B; BAb: anticorpi contro HBV; Etanolo: storia di abuso di alcol; Criptogenici sono quei casi in cui sono stati esclusi: infezioni virali, abuso di alcol, emocromatosi, patologia di Wilson, deficienza di α 1-anti-tripsina, cirrosi biliare primaria, epatite autoimmune e colangite sclerosante primaria.

2) Uni- o multifocalità è stata assegnata sulla base di tecniche di imaging precedenti l'intervento chirurgico.

3) Grado di HCC è stato assegnato attraverso i criteri di Edmonson e Steiner's (74).

4) Livelli di alfa-fetoproteina sono stati misurati prima dell'intervento.

Per l'analisi del profilo di espressione dei miRNA è stata utilizzata una piattaforma microarray contenente 381 sonde per il riconoscimento di 238 microRNA umani maturi e 143 precursori di miRNA (75). In seguito all'ibridazione dei campioni su chip ed all'acquisizione dei dati è stata eseguita una complessa analisi statistica tra i due gruppi di campioni posti a confronto (vedi Paragrafo 2.2), la quale ha consentito di individuare un pannello di miRNA deregolati nell'epatocarcinoma umano. Da tale analisi 35 miRNAs sono risultati essere differenzialmente espressi nei campioni di HCC rispetto ai campioni provenienti da fegato cirrotico (**Tabella 17**).

Tabella 17. MicroRNA differenzialmente espressi tra tessuti di HCC e CE.

MicroRNA	Simbolo	Mappa	Rapporto medio HCC/CE (a)	Regolazione Up o Down in HCC	P-value (b)
let-7a-1	MIRNLET7A1	9q22.2	0,68	DOWN	0,0127
let-7a-2	MIRNLET7A2	11q24.2	0,59	DOWN	0,0136
let-7a-3	MIRNLET7A3	22q13.3	0,63	DOWN	0,0160
let-7b	MIRNLET7B	22q13.3	0,74	DOWN	0,0149
let-7c	MIRNLET7C	21q11.2	0,62	DOWN	0,0193
let-7d	MIRNLET7D	9q22.2	0,66	DOWN	0,0168
let-7d	MIRNLET7D	9q22.2	0,70	DOWN	0,0307
let-7e	MIRNLET7E	19q13.4	0,77	DOWN	0,0245
let-7f-2	MIRNLET7F2	Xp11.2	0,70	DOWN	0,0356
let-7g	MIRNLET7G	3p21.3	0,71	DOWN	0,0307
miR-122a	MIRN122A	18q21	0,63	DOWN	0,0135
miR-124a-2	MIRN124A2	8q12.2	0,69	DOWN	0,0135
miR-130a	MIRN130A	11q12	0,50	DOWN	0,0339
miR-132	MIRN132	17p13.3	0,75	DOWN	0,0152
miR-136	MIRN136	14q32	0,58	DOWN	0,0191
miR-141	MIRN141	12p13	0,74	DOWN	0,0389
miR-142	MIRN142	17q23	0,51	DOWN	0,0082
miR-143	MIRN143	5q32-33	0,72	DOWN	0,0127
miR-145	MIRN145	5q32-33	0,53	DOWN	0,0126
miR-146	MIRN146A	5q34	0,59	DOWN	0,0439
miR-150	MIRN150	19q13	0,47	DOWN	0,0101
miR-155(BIC)	MIRN155	21q21	0,57	DOWN	0,0168
miR-181a-1	MIRN213	1q31.2-q32.1	0,68	DOWN	0,0439
miR-181a-2	MIRN181A	9q33.1-34.13	0,64	DOWN	0,0439
miR-181c	MIRN181C	19p13.3	0,67	DOWN	0,0339
miR-195	MIRN195	17p13	0,75	DOWN	0,0307
miR-199a-1-5p	MIRN199A1	19p13.2	0,45	DOWN	0,0100
miR-199a-2-5p	MIRN199A2	1q24.3	0,43	DOWN	0,0082
miR-199b	MIRN199B	9q34	0,49	DOWN	0,0082
miR-200b	MIRN200B	1p36.33	0,69	DOWN	0,0120
miR-200b	MIRN200B	1p36.3	0,74	DOWN	0,0135
miR-214	MIRN214	1q23.3	0,59	DOWN	0,0124
miR-221	MIRN221	Xp11.3	1,49	UP	0,0339
miR-223	MIRN223	Xq12-13.3	0,44	DOWN	0,0135
pre-mir-594	MIRN594	7q34	0,55	DOWN	0,0500

a. P-value derivante da Analysis of Variance (ANOVA nel software Genespring)

b. I dati di microarray di HCC, per ogni microRNA, sono stati normalizzati utilizzando il tessuto di fegato cirrotico proveniente dallo stesso paziente; se non disponibile, il valore è stato normalizzato utilizzando la media dei tessuti di CE.

Utilizzando questo pannello di miRNA deregolati nell'HCC, è stata effettuata un'analisi di raggruppamento gerarchico la quale ha consentito di ottenere una buona separazione tra i campioni di HCC e di CE (**Figura 10**). In particolare sono emersi due gruppi principali di raggruppamento, uno rappresentato in prevalenza da campioni di HCC e l'altro da campioni di fegato cirrotico. Qualche campione di HCC e di CE è stato incluso nel raggruppamento sbagliato, probabilmente a causa del fatto che i campioni analizzati tendono a raggrupparsi sulla base del profilo individuale del paziente invece che sulla base del tipo di tessuto. I campioni di HCC inclusi nei 2 differenti raggruppamenti non mostrano differenze significative di eziologia, focalità, dimensioni, grado ed espressione di alfa-fetoproteina (AFP), un marcatore circolante di carcinoma epatocellulare. Sofisticata analisi statistiche hanno consentito di evidenziare che la firma molecolare di miRNA è in grado di predire correttamente la maggior parte dei campioni di HCC e di CE, con un'accuratezza dell'86% (algoritmo PAM) (70) e del 91% (algoritmo SVM) (71).

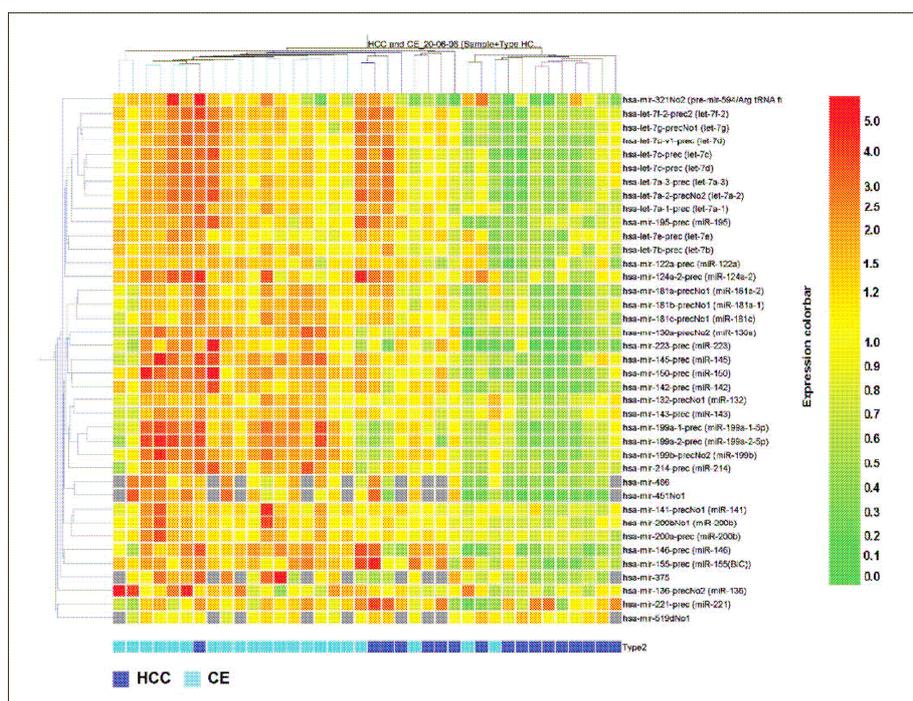


Figura 10. Classificazione di tessuti di HCC e CE in base alla *signature* di 35 miRNA. File: microRNA. Colonne: campioni biologici. Per ogni miRNA, il colore rosso significa un valore di espressione più alto del valore di espressione medio tra tutti i campioni, mentre verde significa un valore di espressione più basso. Nella barra in basso i campioni di HCC sono rappresentati con un quadrato blu, mentre le CE con un quadrato azzurro.

3.1.1 Validazione dell'analisi di microarray tramite Northern blot

Allo scopo di validare i dati ottenuti dall'analisi di microarray e di ampliare la casistica dei pazienti sottoposti a resezione epatica per HCC, sono state utilizzate due tecnologie alternative, Northern blot e Real time PCR. Entrambe le metodologie utilizzate sono in grado di quantificare, in maniera relativa, i livelli di espressione dei microRNA maturi all'interno di campioni biologici.

Per la validazione dei dati di microarray abbiamo scelto tre miRNA deregolati nell'HCC (miR-221, let-7a-1, miR-122). In particolare, dall'analisi di microarray il miR-122 e let-7a-1 risultavano essere sotto-espressi nei campioni di

HCC rispetto ai campioni di CE, mentre il miR-221 risultava sovra-espresso nei campioni di HCC. Tra i 35 miRNA della *signature*, abbiamo deciso di analizzare questi tre miRNA per le seguenti ragioni: il miR-122 rappresenta il 70% di tutti i microRNA espressi nel fegato ed è in grado di modulare l'espressione del virus dell'epatite C (HCV) (55), il miR-221 e let-7a sono deregolati anche in altri tipi di tumore umano (62, 76).

L'analisi di Northern blot, eseguita su di una serie di 40 tessuti di HCC e circostante fegato cirrotico (**Tabella 16**), ha confermato i risultati ottenuti tramite microarray. I casi analizzati sia tramite microarray che Northern blot hanno mostrato un identico profilo di espressione dei miRNA in esame. Inoltre, l'analisi di Northern blot ha rivelato una sovra-espressione del miR-221 nell' 83% dei casi di HCCs se confrontati con i corrispondenti campioni di cirrosi epatica, mentre ha mostrato una sotto-espressione di let-7a-1 e miR-122 nel 70% dei campioni di HCC. Una selezione dei campioni analizzati tramite Northern blot è mostrata in Figura 11.

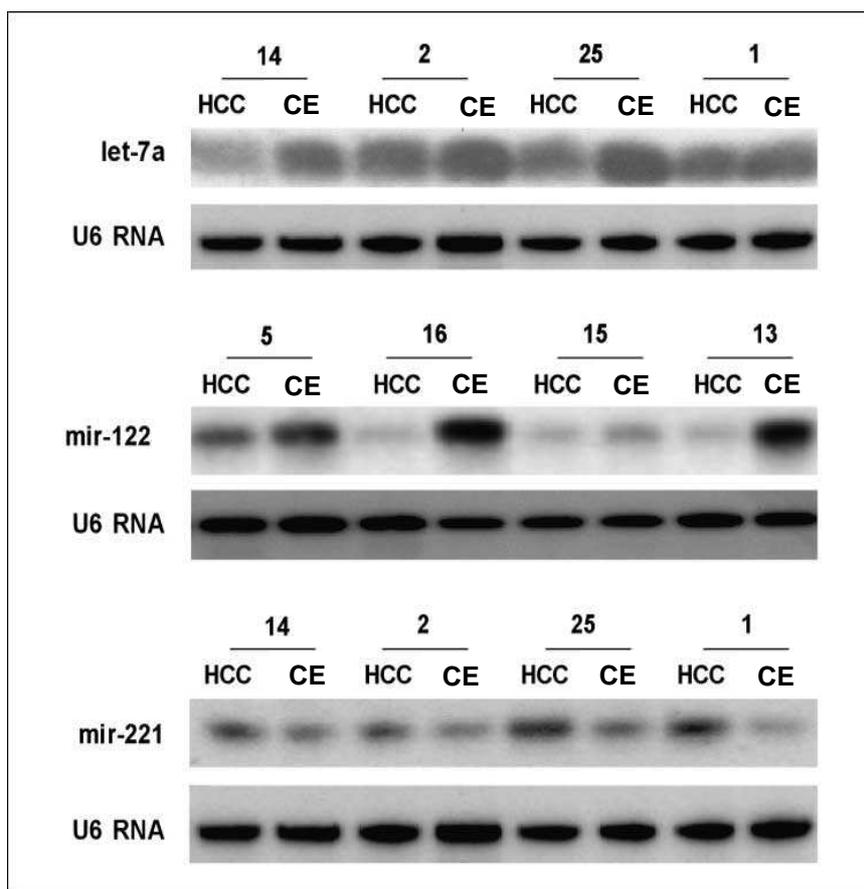


Figura 11. Risultati rappresentativi dell'analisi di Northern blot di let-7a, miR-122 e miR-221. Analisi effettuata su 8 campioni di HCC e circostante CE.

3.1.2 Validazione dell'analisi di microarray tramite Real time PCR

I livelli di espressione degli stessi tre microRNA validati tramite analisi di Northern blot sono stati valutati tramite Real time PCR con TaqMan microRNA assay su 38 campioni di HCC e CE (**Tabella 16**). I risultati di tale analisi hanno confermato la sotto-espressione di miR-122 and let-7a e la sovra-espressione di miR-221 nei campioni di HCC quando confrontati con i rispettivi campioni di CE (**Tabella 18**).

Tabella 18. Espressione di microRNA in HCC e CE valutata tramite analisi di Real time PCR e microarray. La media dei valori è riportata. I p-value riportati sono stati calcolati tramite t-test.

miR	Real-Time				Microarray			
	CE	HCC	HCC/CE	p-value	CE	HCC	HCC/CE	p-value
miR-122	0,71	0,35	0,49	0,00956	0,99	0,63	0,63	0,00352
miR-221	0,65	1,23	1,89	0,00536	1,01	1,52	1,49	0,0312
let-7a-1	2,35	1,42	0,60	0,00918	1,02	0,69	0,68	0,00869

3.2 Studio del ruolo biologico del microRNA-122: regolazione della ciclina G1 in linee cellulari di epatocarcinoma

Terminata la validazione dei dati di microarray, abbiamo eseguito un'analisi funzionale per caratterizzare il ruolo bio-patologico dei microRNA nel processo di epatocarcinogenesi.

Abbiamo inizialmente focalizzato la nostra attenzione sul miR-122, il quale risultava sotto-espresso nel 70% dei campioni provenienti da tessuto neoplastico rispetto ai campioni provenienti dal fegato cirrotico circostante. Il miR-122 è un microRNA epato-specifico, infatti rappresenta il 70% circa di tutti i miRNA espressi nel fegato (77). Dati di letteratura riportano il ruolo del miR-122 nella regolazione di importanti vie metaboliche quali la biosintesi del colesterolo ed il metabolismo lipidico (53, 54) ed il ruolo nella modulazione della replicazione del virus dell'epatite C (HCV), tramite appaiamento ad una sequenza complementare presente nella porzione 5' dell'RNA virale (55).

Poiché l'individuazione di geni regolati dai microRNA è uno step necessario per studiare la loro funzione biologica ed il loro coinvolgimento nel processo di carcinogenesi, abbiamo eseguito un'iniziale analisi bio-informatica al fine di individuare putativi geni bersaglio del microRNA-122. In particolare, per la

predizione di ipotetici geni target ci siamo avvalsi di algoritmi predittivi quali miRanda, TargetScan e PicTar. Successivamente, tramite l'utilizzo del software MatchMiner abbiamo eseguito un'analisi di intersezione degli out-put provenienti da due o più algoritmi al fine di individuare i bersagli molecolari più significativi e con un valore predittivo più elevato. Tra gli RNA messaggeri (mRNA) regolati dal miR-122, il gene della ciclina G1 (CCGN1) risultava un out-put sia dell'algoritmo PicTar che di TargetScan (**Figura 12A**).

La ciclina G1 è stata inizialmente scoperta come un nuovo membro della famiglia delle cicline con omologia al gene c-src e, successivamente, è stata identificata come bersaglio trascrizionale di p53, possedendo due siti di legame per questo fattore di trascrizione (78, 79). Inoltre, la ciclina G1 esercita una regolazione a feedback negativo sulla proteina p53 attraverso il reclutamento della subunità β' della fosfatasi 2a (PP2A) determinando la defosforilazione di Mdm-2 (80). Ad oggi, il ruolo preciso della ciclina G1 sulla crescita cellulare è ancora controverso (81). Alcuni studi, basati sull'osservazione che la sovra-espressione della ciclina G1 aumenta la crescita cellulare di cellule cancerose e che il suo silenziamento determina arresto della crescita (82), riportano un'attività di promozione della proliferazione cellulare da parte della ciclina G1. In linea con questi dati, la sovra-espressione della ciclina G1 è stata ritrovata in numerosi tumori umani tra cui l'osteosarcoma, il cancro della mammella ed il leiomioma (82-84). Al contrario, l'induzione della ciclina G1 in seguito a danno al DNA ed il suo ruolo nell'arresto del ciclo cellulare nella fase G2/M suggeriscono una possibile attività di inibizione della crescita da parte della ciclina G1 (85, 86). Uno studio recente indica che il ruolo della ciclina G1 nel processo di proliferazione cellulare è dipendente dai livelli di espressione della proteina stessa

(87), fornendo una possibile spiegazione ai controversi dati riportati in letteratura. In aggiunta, è stato precedentemente dimostrato che topi knock-out per la ciclina G1 successivamente trattati con un potente epato-carcinogeno, N-dietil-nitrosamina, mostrano una ridotta incidenza di tumori, probabilmente dovuta ad un'incrementata attività di p53 (88).

Alla luce di questi dati ed al fine di caratterizzare il meccanismo di regolazione della ciclina G1 da parte del miR-122, abbiamo analizzato tramite Northern blot e Real time PCR l'espressione del miR-122 in 4 linee di HCC: Hep3B, SNU182, SNU398 e SNU449. Entrambe le tecniche hanno mostrato un'assenza di espressione costitutiva del miR-122 in tutte e quattro le linee cellulari testate; i livelli di miR in tali linee sono risultati infatti non rilevabili quando confrontati con un campione di riferimento rappresentato da tessuto proveniente da fegato sano (FS) (**Figura 12B, C**). Inoltre, abbiamo analizzato tramite Western blot i livelli proteici di ciclina G1 nelle stesse quattro linee ed abbiamo osservato un'elevata espressione basale della ciclina G1 in tutte le linee cellulari analizzate (**Figura 12D**). Abbiamo quindi selezionato le linee Hep3B e SNU449 per i successivi saggi funzionali.

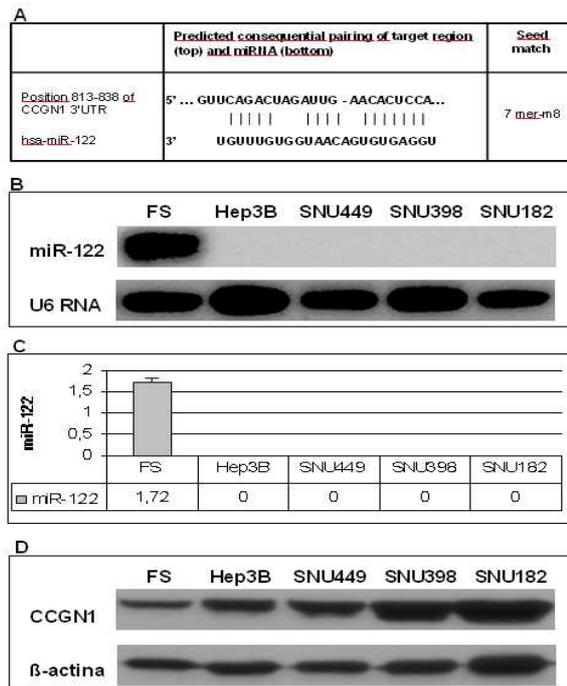


Figura 12. La ciclina G1 è un ipotetico target del miR-122. (A) Ipotetico sito bersaglio del miR-122 nella regione 3'UTR della ciclina G1 (CCGN1), come predetto dall'algoritmo TargetScan. (B) Analisi Northern blot del miR-122 su 4 linee di HCC e su un campione di fegato sano (FS). La sonda U6RNA è stata utilizzata come gene housekeeping. (C) Analisi di Real time PCR del miR-122. La sonda U6RNA è stata utilizzata come gene housekeeping. Nell'asse delle ordinate è riportato il valore di $2^{(-\delta\delta Ct)}$ in scala lineare. Un pool di tre FS è stato utilizzato come campione di riferimento per il calcolo del $\delta\delta Ct$. Ogni campione è stato analizzato in triplicato. Nel grafico è riportato il valore medio e la deviazione standard (SD) di ciascun campione. (D) Analisi Western blot della ciclina G1 su linee di HCC e un FS. La β -actina è stata utilizzata come gene housekeeping per la normalizzazione dei campioni.

In particolare, al fine di studiare la regolazione dell'espressione genica della ciclina G1 da parte del miR-122 abbiamo trasfettato entrambe le linee con un oligonucleotide precursore del miR-122 (pre-miR-122) o con un oligonucleotide di controllo (NC) ed abbiamo analizzato la variazione dei livelli di ciclina G1 tramite Western blot. Dopo 24h dalla trasfezione, abbiamo misurato i livelli di miR-122 tramite Real time PCR in entrambe le linee trasfettate. Come mostrato in

Figura 13A, i livelli di miR nelle cellule trasfettate con il miR-122 risultano simili a quelli del fegato sano, perciò il ripristino dei livelli di miR-122 *in vitro* porta al ripristino dei livelli fisiologici del miR-122. La trasfezione del miR-122 in Hep3B e SNU449 ha determinato una riduzione dei livelli di espressione della ciclina G1 del 55% e 25%, rispettivamente (**Figura 13B**).

Per determinare se il predetto sito del miR-122 presente nel 3'UTR della ciclina G1 (CCGN1) era effettivamente responsabile della sua regolazione, abbiamo clonato un'ampia porzione del 3'UTR di ciclina G1, contenente la regione complementare al miR-122, a valle del gene reporter presente nel vettore pGL3. Abbiamo nominato tale vettore ricombinante pGL3-CCGN1 e l'abbiamo utilizzato in esperimenti di co-trasfezione con il miR-122 o con un controllo negativo nelle cellule Hep3B. Il vettore pRL-TK, contenente il gene di Luciferasi di Renilla, è stato utilizzato come vettore di controllo per la normalizzazione dell'attività luciferasica con il saggio Dual Luciferase assay (Promega). Come mostrato in figura 13C, l'attività luciferasica è diminuita di 2 volte nelle cellule co-trasfettate con il miR-122 (miR) rispetto alle cellule trasfettate con il vettore da solo ($p=0.0008$, t test) e di 1.5 volte rispetto alle cellule co-trasfettate con il controllo negativo (NC) ($p=0.0038$, t test). Presi insieme, tali dati dimostrano che la ciclina G1 è un bersaglio diretto del miR-122 nelle linee cellulari di HCC.

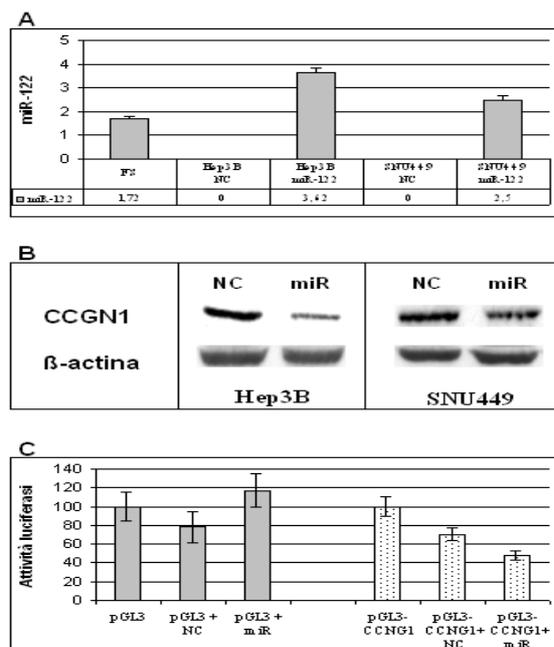


Figura 13. La ciclina G1 è un target del miR-122. (A) Analisi di Real time PCR del miR-122 in Hep3B e SNU449 trasfettate con il miR-122 o con un controllo negativo (NC). Il campione di fegato sano (FS) è stato utilizzato come campione di riferimento per i livelli fisiologici di miR-122. La sonda U6RNA è stata utilizzata come gene housekeeping. Nell'asse delle ordinate è riportato il valore di $2^{-(\delta\delta Ct)}$ in scala lineare. Ogni campione è stato analizzato in triplicato. Nel grafico è riportato il valore medio e la deviazione standard (SD) di ciascun campione. (B) Analisi di Western blot della ciclina G1 (CCGN1) nelle linee Hep3B e SNU449 trasfettate con miR-122 (miR) o con il controllo negativo (NC). La β -actina è stata utilizzata come gene housekeeping. (C) Saggio di luciferasi nelle cellule Hep3B. L'attività luciferasica del vettore pGL3-CCGN1 è significativamente ridotta in presenza del miR-122 (miR) rispetto al controllo negativo (NC) o al vettore da solo. L'attività di luciferasi di Lucciola è stata normalizzata con l'attività di luciferasi di Renilla contenuta nel vettore pRL-TK. Ogni campione è stato analizzato in triplicato in due esperimenti diversi. Colonne: valore medio; barre: deviazione standard.

Successivamente, i livelli di espressione del miR-122 e del suo bersaglio, ciclina G1, sono stati analizzati in campioni provenienti da HCC e da tessuto cirrotico circostante la neoplasia. L'analisi *ex vivo* ha mostrato la presenza di una correlazione inversa tra miR-122 e ciclina G1 in campioni di HCC (**Figura 14**). Tale dato suggerisce che il miR-122 potrebbe giocare un ruolo importante nella

regolazione dei livelli di ciclina G1 nel tessuto epatico ed avere un ruolo chiave nel processo di epatocarcinogenesi.

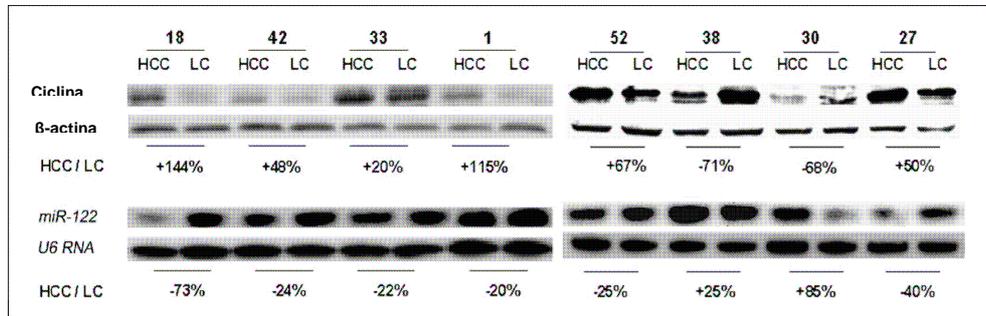


Figura 14. Correlazione inversa tra ciclina G1 e miR-122 in tumori primari di HCC. I livelli di miR-122 nei campioni di HCC sono stati analizzati tramite Northern blot e normalizzati sulla base dei livelli del gene housekeeping U6RNA. I livelli di ciclina G1 sono stati analizzati tramite Western blot e normalizzati sulla base del gene housekeeping β -actina. I valori percentuale rappresentano l'incremento o la diminuzione di miR-122 e della ciclina G1 nei campioni di HCC rispetto al circoostante fegato cirrotico (LC).

3.2.1 Il microRNA-122 regola l'espressione e la stabilità di p53 attraverso la modulazione di ciclina G1

Dati di letteratura dimostrano che la ciclina G1, attraverso il reclutamento della fosfatasi 2a (PP2A), è in grado di regolare negativamente la stabilità della proteina p53 (80). Sulla base di queste osservazioni, abbiamo deciso di investigare il ruolo del miR-122 nella modulazione di p53 in linee cellulari derivate da epatocarcinoma.

La linea cellulare HepG2 è stata selezionata per la sovra-espressione del miR-122 in quanto non esprime tale miR a livello basale, mentre possiede un'isoforma wild-type di p53 ed alti livelli proteici di ciclina G1 (**Figura 15A, B**). Quarantotto ore dopo la trasfezione, l'espressione del miR-122 è stata valutata tramite Real time PCR e paragonata a quella di tessuti provenienti da fegato sano, HCC e

fegato cirrotico. Le cellule trasfettate mostrano livelli di miR-122 paragonabili a quelli del fegato sano (5.5 verso 4.7, rispettivamente), mentre le cellule trasfettate con il controllo negativo, mostrano livelli non rilevabili di miR-122 (**Figura 15A**). Al contrario, il silenziamento del miR-122 è stato eseguito nella linea cellulare Huh-7 in quanto essa è l'unica linea di HCC che esprime costitutivamente il miR-122 (55) in presenza di bassi livelli di ciclina G1 (**Figura 15A, B**). Inoltre, la linea cellulare Huh-7 possiede un'isoforma mutata della proteina p53, come nel 30% dei casi di HCC (89). Una riduzione di 3.2 volte dei livelli di miR-122 è stata osservata dopo trasfezione delle cellule Huh-7 con l'anti-miR-122 quando confrontato con cellule trasfettate con un oligonucleotide di controllo (**Figura 15A**).

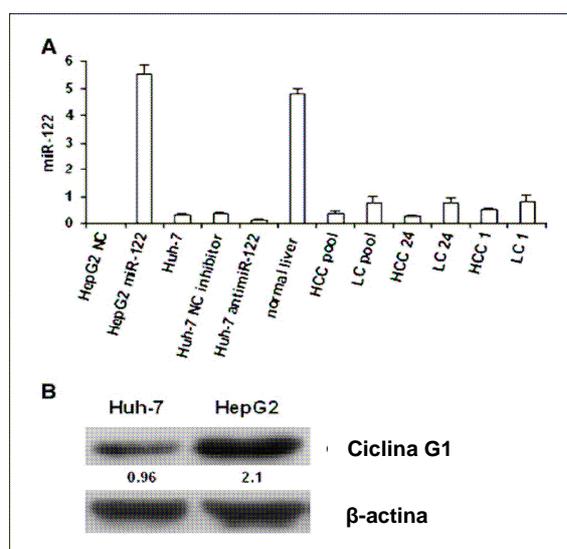


Figura 15. Espressione del miR-122 in linee cellulari e campioni di HCC. (A) Real time PCR del miR-122 in cellule trasfettate, campioni provenienti da fegato sano, HCC e fegato cirrotico (LC) di due pazienti (Tabella 19, N° 1 e 24). I pool di HCC e LC si riferiscono a pool di 4 campioni di HCC e di LC (Tabella 19, N°: 5, 21, 38 e 56). Il gene U6RNA è stato utilizzato come gene housekeeping. Nell'asse delle ordinate è riportato il valore di $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ in scala lineare. Ogni campione è stato analizzato in triplicato. Colonne: valore medio; Barre: deviazione standard. (B) Analisi Western blot per la ciclina G1 sulle linee Huh-7 e HepG2. La β -actina è stata utilizzata come gene housekeeping. I valori riportati indicano il rapporto tra il valore di densitometria della ciclina G1 e quello della β -actina.

In seguito abbiamo valutato tramite analisi di Western blot i livelli di espressione della ciclina G1 in seguito a trasfezione delle cellule col miR-122. Una diminuzione di 2.0 volte dei livelli di espressione della ciclina G1 ed un incremento dei livelli proteici di p53 pari a 2.1 volte è stato osservato nelle cellule HepG2 trasfettate con il miR-122 rispetto alle cellule trattate con un oligonucleotide di controllo (NC) (**Figura 16A**). Al contrario il silenziamento del miR-122 nelle cellule Huh-7 ha portato ad un incremento di 2.2 volte dei livelli di espressione della ciclina G1 (**Figura 16B**). L'espressione di p53 non è stata analizzata poichè le cellule Huh-7 esprimono un'isoforma mutata di p53 che porta ad accumulo della stessa a livello nucleare.

Per verificare che la ciclina G1 fosse direttamente responsabile della modulazione di p53 in seguito a trasfezione del miR-122, abbiamo silenziato il gene della ciclina G1 attraverso due differenti sequenze di small interfering RNA (G1/238 e G1/832 siRNA) nella linea cellulare HepG2. La figura 16C mostra una significativa diminuzione dei livelli di mRNA della ciclina G1 in seguito a trasfezione con entrambi i siRNA G1/238 e G1/832. Il silenziamento della ciclina G1 attraverso due diverse sequenze nucleotidiche dimostra che la sua regolazione è specifica e non dovuta ad effetto 'off-target'. Abbiamo scelto il siRNA G1/832 per i successivi esperimenti in quanto esso si è dimostrato più efficace nel silenziamento della ciclina G1. Il silenziamento di ciclina G1 nelle cellule HepG2 ha portato ad una diminuzione di 1.5 volte dei livelli proteici di ciclina G1 ed un aumento di 1.4 volte nei livelli della proteina p53 (**Figura 16D**). Presi insieme, questi dati suggeriscono che, attraverso la regolazione di ciclina G1, il miR-122 modula l'espressione di p53.

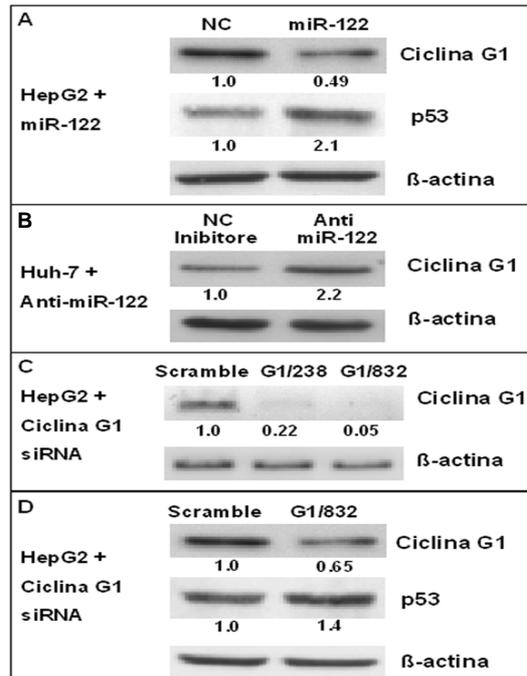


Figura 16. Il miR-122 e la ciclina G1 regolano l'espressione di p53. (A, B) Analisi di Western blot di ciclina G1 e p53 in seguito a trasfezione con il miR-122 o l'anti-miR-122 in cellule HepG2 e Huh-7. (C) Analisi di RT-PCR in seguito a silenziamento con G1/238 e G1/832 siRNA o controllo negativo (Scramble) in cellule HepG2. (D) Analisi di Western blot di ciclina G1 e p53 in seguito a silenziamento con G1/832 siRNA in cellule HepG2. La β -actina è stata utilizzata come gene housekeeping sia nell'analisi di WB che di RT-PCR. I valori riportati indicano il rapporto tra il valore di densitometria della ciclina G1, di p53 e quello della β -actina.

Poiché la fosforilazione di p53 a livello del residuo aminoacidico Ser-20 modula l'interazione con l'inibitore Mdm-2, aumentando l'emivita e l'attività trascrizionale di p53 (90), abbiamo testato l'effetto del miR-122 e della ciclina G1 sui livelli di fosforilazione della Ser-20. L'analisi di Western blot ha mostrato un aumento della fosforilazione della Ser-20 nelle sia cellule HepG2 trasfettate col miR-122 che in quelle silenziate per la ciclina G1 (5.0 e 3.0 volte, rispettivamente) (**Figura 17A**). Per valutare il ruolo del miR-122 e della ciclina G1 sull'attività trascrizionale di p53, abbiamo misurato l'attività luciferasica di un vettore reporter contenente elementi responsivi a p53 (pp53-TA-luc) in seguito a co-trasfezione col miR-122 o con il siRNA G1/832 per la ciclina G1 nella linea

cellulare HepG2. Un aumento significativo ($p < 0.01$, t-test) dell'attività luciferasica è stato osservato sia nelle cellule sovra-esprimenti il miR-122 che in quelle silenziate per la ciclina G1 (2.6 e 1.5 volte, rispettivamente), rispetto alle cellule co-trasfettate con oligonucleotidi di controllo (**Figura 17B**). Per confermare l'aumento di attività trascrizionale di p53, abbiamo valutato l'espressione degli mRNA di due geni target di p53, Bax e Puma. Come mostrato in Figura 17C, entrambi i target trascrizionali di p53 risultano sovra-espressi sia nelle cellule trasfettate col miR-122 che in quelle silenziate per la ciclina G1. Presi insieme, questi dati dimostrano che il miR-122 induce l'aumento dell'attività trascrizionale di p53, almeno in parte, attraverso la regolazione della ciclina G1.

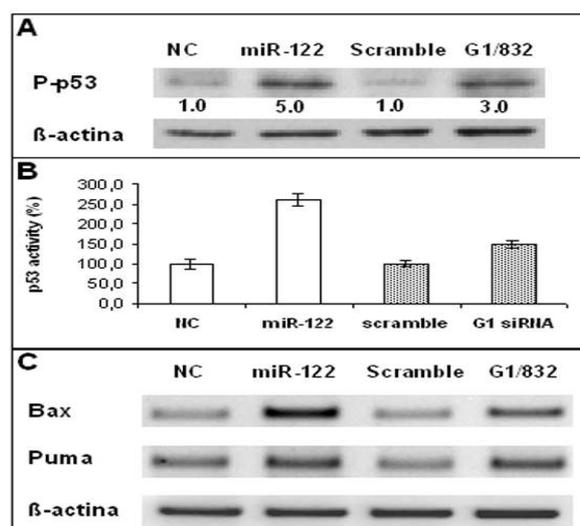


Figura 17. Il miR-122 e la ciclina G1 regolano l'attività trascrizionale di p53. (A) Analisi di Western blot di fosfo-p53 (Ser-20) in HepG2 trasfettate col miR-122, con G1/832 siRNA o con controlli negativi (NC, Scramble). La β -actina è stata utilizzata come gene housekeeping. I valori riportati indicano il rapporto tra il valore di densitometria di fosfo-p53 e quello di β -actina. (B) Le cellule HepG2 sono state co-trasfettate con vettore responsivo a p53 (pp53TA-luc) o vettore vuoto (pTA-luc) in presenza di miR-122, G1/832 siRNA o controlli negativi. L'attività di luciferasi è stata valutata 24h dopo la trasfezione. I risultati sono riportati come rapporto dell'attività luciferasica delle cellule trasfettate con pp53TA-luc rispetto a quelle trasfettate con pTA-luc. Colonne: valore medio di due esperimenti indipendenti; Barre: deviazione standard. (C) Analisi di RT-PCR di Bax e Puma in seguito a sovra-espressione del miR-122 o silenziamento con G1/238 siRNA in cellule HepG2. La β -actina è stata utilizzata come gene housekeeping.

Da notare che l'aumento di p53 in seguito alla trasfezione col miR-122 è più elevato rispetto a quello indotto dal silenziamento della ciclina G1. Questo dato suggerisce che il miR-122 possa regolare l'espressione di più di un gene bersaglio appartenente al pathway di p53. Abbiamo quindi eseguito un'analisi bioinformatica (attraverso l'algoritmo miRanda), la quale ha consentito di individuare la subunità regolatoria β' , isoforma- β (PPP2R5B), della fosfatasi 2a (PP2A) come ipotetico gene bersaglio del miR-122. Dati di letteratura riportano che l'associazione della ciclina G1 con la subunità β' della PP2A promuove la defosforilazione del repressore di p53, Mdm-2 (91, 92); perciò, una diretta regolazione della subunità regolatoria di PP2A da parte del miR-122 potrebbe aumentare l'effetto mediato dalla ciclina G1. La figura 18 mostra l'aumento dei livelli di p53 sia dopo il silenziamento della subunità PPP2R5B che in seguito alla trasfezione col miR-122 (2.4 e 1.9 volte, rispettivamente). Questi dati suggeriscono che l'inibizione di ciclina G1 e di PPP2R5B da parte del miR-122 contribuiscono entrambe alla modulazione dell'espressione di p53. Ulteriori studi saranno necessari per elucidare i meccanismi molecolari attraverso cui il miR-122 regola l'espressione di PPP2R5B.

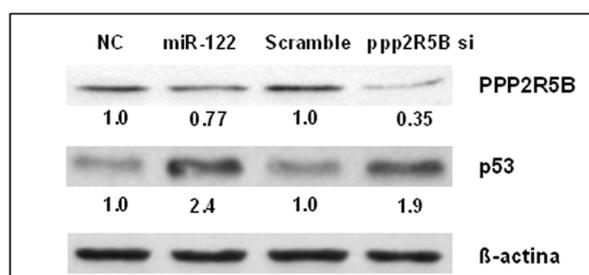


Figura 18. La subunità PPP2R5B regola l'espressione di p53 nella linea HepG2. Analisi di Western blot per p53 e PPP2R5B in seguito a trasfezione con miR-122, PPP2R5B siRNA o controlli negativi (NC, Scramble) in cellule HepG2. La β -actina è stata utilizzata come gene housekeeping. I valori riportati indicano il rapporto tra il valore di densitometria di fosfo-p53, di PPP2R5B e quello della β -actina.

3.2.2 Il microRNA-122 e la ciclina G1 regolano il ciclo cellulare e l'invasione della linea cellulare HepG2

Un'attenta osservazione al microscopio delle cellule HepG2 in seguito a trasfezione col miR-122 o al silenziamento della ciclina G1 ha evidenziato una diminuita crescita cellulare ed una variazione della morfologia, con cellule più allungate e con protrusioni citoplasmatiche. Queste osservazioni hanno suggerito che il silenziamento della ciclina G1 mediata dai siRNA o dal miR-122 modifica il fenotipo cellulare della linea HepG2 (**Figura 19A**). Abbiamo perciò analizzato la distribuzione delle cellule nelle differenti fasi del ciclo cellulare attraverso analisi di citofluorimetria (FACS). Un aumento del 20% della popolazione cellulare nella fase G1 ed una diminuzione delle cellule nella fase G2/M è stato osservato in seguito a trasfezione con miR-122 o silenziamento di ciclina G1 (**Figura 19B**). La diminuzione delle cellule nella fase G2/M è in accordo con precedenti dati di letteratura che descrivono la regolazione del check-point G2/M da parte della ciclina G1(85).

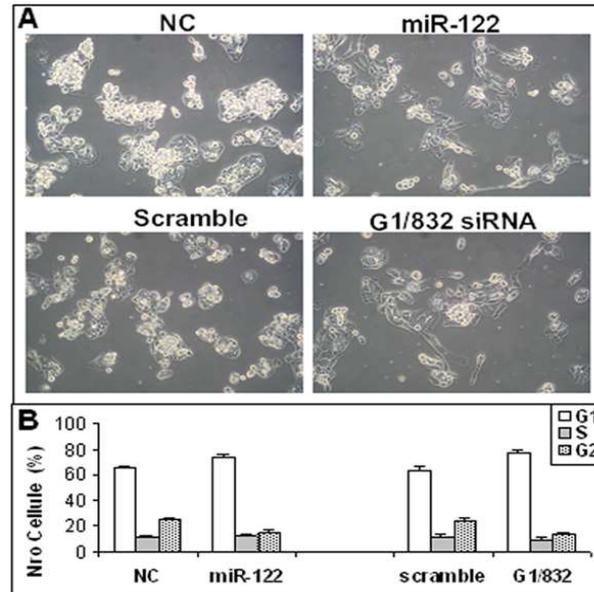


Figura 19. Il miR-122 e la ciclina G1 influenzano la morfologia ed il ciclo cellulare della linea HepG2. (A) Analisi al microscopio confocale di cellule HepG2 trasfettate con miR-122, ciclina G1 siRNA e controlli negativi (NC, Scramble); ingrandimento 10X. (B) Analisi del ciclo cellulare di cellule HepG2 trasfettate con miR-122, ciclina G1 siRNA e controlli negativi. Colonne: valore medio di due esperimenti indipendenti; barre: deviazione standard.

Per caratterizzare ulteriormente l'effetto del miR-122 e del suo gene target, ciclina G1, nella modulazione del fenotipo delle cellule HepG2 abbiamo analizzato la capacità invasiva delle cellule trasfettate con miR-122 o G1/832 siRNA tramite Matrigel assay. Il saggio di invasione ha mostrato una diminuzione del numero di cellule in grado di attraversare lo strato di Matrigel, sia nelle cellule trasfettate col miR-122 (1.6 volte, $p=0.006$, t-test) che in quelle silenziate per la ciclina G1 (1.3 volte, $p=0.04$, t-test) (Figura 20A). Allo scopo di investigare i pathway molecolari coinvolti nella modulazione della capacità invasiva delle cellule trasfettate con miR-122 o G1/832 siRNA, abbiamo analizzato l'espressione della proteina E-caderina, una molecola nota per il suo ruolo nei processi adesione tra cellule e nell'invasione cellulare (93). L'analisi di Western

blot ha mostrato un aumento dei livelli di espressione della E-caderina nelle cellule sovra-esprimenti il miR-122 (1.5 volte), come pure nelle cellule silenziate per la ciclina G1 (1.3 volte) (**Figura 20B**). Poiché non è stata osservata nessuna regolazione a livello dell'mRNA di E-caderina, abbiamo ipotizzato un meccanismo di regolazione post-trascrizionale. Inoltre, un'analisi bio-informatica (algoritmo miRanda) ha evidenziato che PDGF1A e c-Met sono bersagli ipotetici del miR-122, suggerendo che tale microRNA potrebbe regolare l'invasione attraverso la modulazione di multipli pathway molecolari. Presi insieme, tali dati suggeriscono un ruolo attivo del miR-122 sia nella modulazione del ciclo cellulare che dell'invasione in linee cellulari derivate da epatocarcinoma.

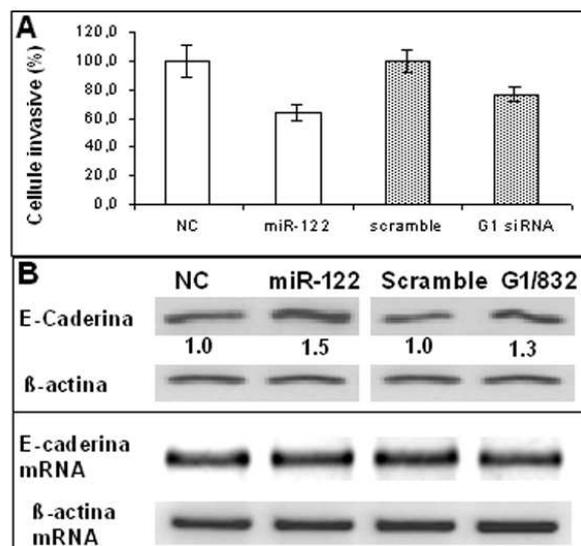


Figura 20. Il miR-122 e la ciclina G1 regolano l'invasione della linea cellulare HepG2. (A) Matrigel assay di cellule HepG2 trasfettate con miR-122 o G1/832 siRNA. Quattro campi indipendenti sono stati considerati per la conta delle cellule invasive ad un ingrandimento di 25X. Colonne: valore medio; barre: deviazione standard. (B) Analisi di Western blot ed RT-PCR per la E-caderina in cellule HepG2 trasfettate con miR-122, G1/832 siRNA o controlli negativi. La β -actina è stata utilizzata come gene housekeeping sia nell'analisi di Western blot che di RT-PCR. I valori riportati indicano il rapporto tra il valore di densitometria di E-caderina e β -actina.

3.2.3 Il microRNA-122 e la ciclina G1 sensibilizzano la linea cellulare HepG2 al trattamento con Doxorubicina

In seguito alla trasfezione con miR-122 o ciclina G1 siRNA nelle cellule HepG2 non è stata osservata alcuna variazione nel processo di morte cellulare (conta con Trypan Blue). Nonostante questo, poiché la ciclina G1 è attivata in risposta al danno al DNA (86), abbiamo investigato la modulazione della sensibilità al trattamento con il chemioterapico Doxorubicina delle cellule HepG2 in seguito a sovra-espressione del miR-122 o silenziamento della ciclina G1. Abbiamo scelto la Doxorubicina poiché al momento è il farmaco anti-neoplastico più utilizzato nel trattamento dell'HCC in stadio intermedio-avanzato. Inoltre la Doxorubicina induce morte cellulare per apoptosi in maniera sia p53 dipendente che indipendente (94), abbiamo quindi testato entrambe le linee cellulari HepG2 e Huh-7 che differiscono per lo status di p53 e l'espressione del miR-122. Le cellule HepG2 sono state trasfettate sia con il miR-122 che con il siRNA contro ciclina G1 e sottoposte per 24h a trattamento con Doxorubicina. L'analisi al FACS per l'Anexina V ha rivelato un aumento del numero di cellule apoptotiche sia nelle cellule trasfettate con il miR-122 (1.3 volte, $p=0.001$, t-test) che con G1/832 siRNA (1.2 volte, $p=0.002$, t-test) (**Figura 21A**). Come ulteriore prova, abbiamo saggiato tramite Western blot i livelli di espressione della caspasi-3 attivata ed abbiamo osservato un incremento della sua attivazione sia nelle cellule trasfettate col miR-122 che nelle cellule silenziate per la ciclina G1 (1.3 e 3.2 volte, rispettivamente). Inoltre, l'analisi del target trascrizionale di p53 ad attività pro-apoptotica, Puma, ha mostrato un aumento dell'espressione sia nelle cellule sovra-esprimenti il miR-122 che in quelle trasfettate con G1/832 siRNA (1.7 e 1.4

volte, rispettivamente) (**Figura 21B**). Poichè la linea cellulare Huh-7 esprime costitutivamente il miR-122, questa linea è stata utilizzata per investigare l'effetto del silenziamento del miR-122 in seguito a trattamento con Doxorubicina. Nelle cellule Huh-7 trattate con anti-miR-122 è stata osservata una diminuzione di 1.2 volte del numero di cellule apoptotiche ($p=0.001$, t-test), mentre, in maniera simile a quanto osservato nella linea HepG2, il silenziamento della ciclina G1 ha portato ad un aumento della suscettibilità delle cellule Huh-7 al trattamento con Doxorubicina (1.3 volte, $p=0.05$, t-test). (**Figura 21C**). Presi insieme, questi dati dimostrano che il miR-122 aumenta la suscettibilità delle cellule di epatocarcinoma al trattamento con Doxorubicina attraverso vie molecolari sia p53 dipendenti che indipendenti.

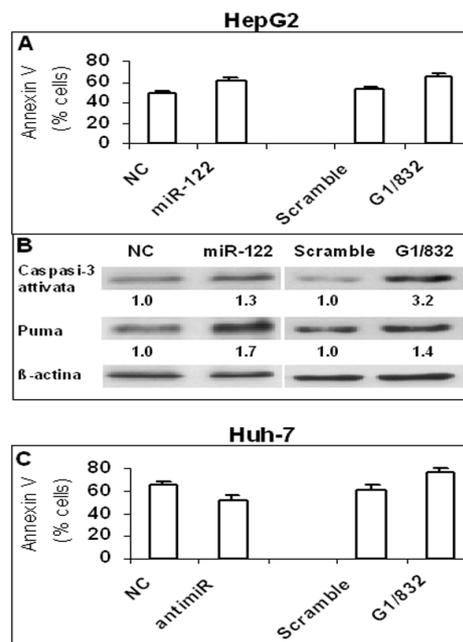


Figura 21. Il miR-122 e la ciclina G1 influenzano la sensibilità alla Doxorubicina in linee cellulari di HCC. (A) FACS Annexin V assay in cellule HepG2 trasfettate con miR-122 o G1/832 siRNA e trattate con Doxorubicina (5.0 $\mu\text{g/ml}$). (B) Analisi di Western blot per lacaspasi-3 attivata e Puma in cellule HepG2 trasfettate con miR-122 o G1/832 siRNA. La β -actina è stata utilizzata come gene housekeeping. I valori riportati indicano il rapporto tra il valore di densitometria dei 2 geni e quello della β -actina. (C) FACS Annexin V assay in cellule Huh-7 trasfettate con anti-miR-122 o G1/832 siRNA e trattate con doxorubicina (5 $\mu\text{g/ml}$). Colonne: valore medio di 3 esperimenti indipendenti; barre: deviazione standard.

3.2.4 Il microRNA-122 e la ciclina G1 correlano con variabili clinico-patologiche di pazienti con epatocarcinoma

Per verificare se i dati ottenuti *in vitro* potessero avere un significato funzionale anche *in vivo*, abbiamo analizzato l'espressione del miR-122 tramite Real time PCR in 57 campioni provenienti da tessuto di HCC e circostrante fegato cirrotico (**Tabella 19**). A causa della limitata disponibilità dei pezzi chirurgici, l'espressione della ciclina G1 è stata analizzata attraverso analisi di Western blot solo in 35 dei 57 campioni di HCC. L'analisi Kaplan-Meier ha rivelato che bassi livelli di miR-122 correlano con un ridotto tempo di insorgenza della recidiva epatica (TTR) (**Figura 22A**), viceversa non è stata osservata alcuna correlazione statisticamente significativa con i dati di sopravvivenza (**Figura 22B**). Al contrario, bassi livelli di ciclina G1 sono risultati significativamente associati ad un aumento della sopravvivenza dei pazienti sottoposti a resezione epatica per HCC, ma non con il TTR (**Figura 22C, D**). Nessuna correlazione è stata osservata tra l'espressione del miR-122 o della ciclina G1 ed i livelli di alfa-fetoproteina (AFP), le dimensioni del tumore, il grado di focalità, l'eziologia ed il grado istopatologico degli epatocarcinomi analizzati.

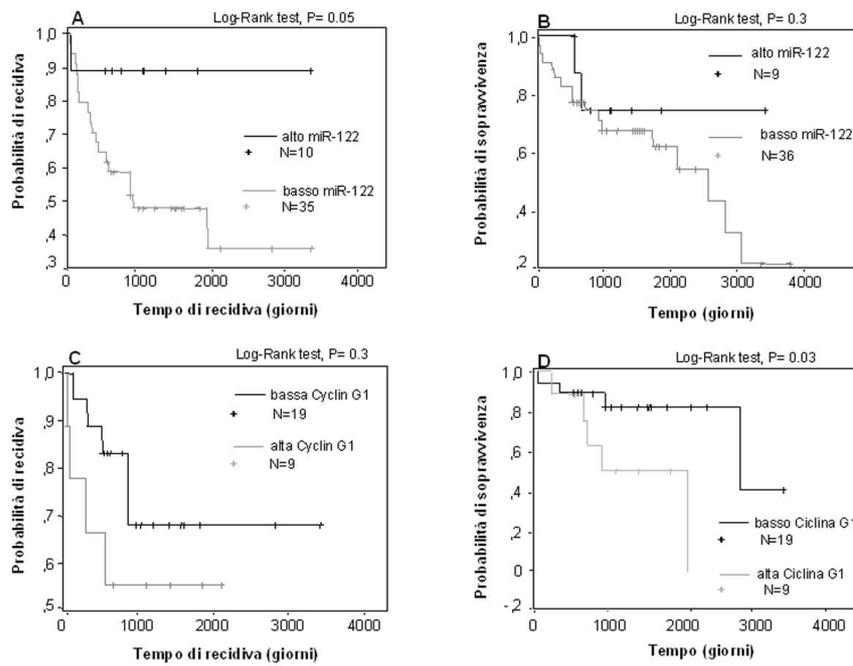


Figura 22. Probabilità di insorgenza della recidiva epatica e sopravvivenza in pazienti con HCC. (A, B) Associazione tra i livelli di miR-122 ed il TTR o la sopravvivenza. Alti e bassi livelli di miR-122 sono stati categorizzati in base al valore medio. (C, D) Associazione tra i livelli di ciclina G1 ed il TTR o la sopravvivenza. Alti e bassi livelli di ciclina G1 sono stati categorizzati in base al valore medio. I log-rank p-value provengono dall'analisi di Kaplan-Meier.

Tabella 19. Caratteristiche dei pazienti analizzati nello studio del microRNA-122.

N.	Età	Genere	Eziologia (1)	Focalità (2)	Dimensioni (3)	AFP (4)	Grado (5)
1	65	M	HBV+Ethanol	uni	3.0	5.0	G2
2	52	M	None	uni	5.0	5.0	G2
3	70	M	HCV	uni	4.0	35	G3
4	65	F	HCV	uni	3.0	3.0	G3
5	62	F	HCV	uni	3.0	76	G3
6	67	M	HCV	uni	6.0	3352	G2
7	77	M	HBV-Ab	uni	5.0	4.0	G3
8	70	F	Ethanol	uni	5.0	537	G3
9	65	M	HCV+Ethanol	uni	3.0	20	G3
10	80	F	HCV	uni	5.0	76	G3
11	59	F	HCV	uni	6.0	7.0	G4
12	66	F	HCV	uni	8.0	9572	G3
13	68	F	None	uni	5.5	2.0	G3
14	59	M	HCV	uni	5.0	86	G3
15	82	F	HCV	uni	7.5	964	G3
16	60	M	Ethanol	uni	1.8	156	G2
17	78	M	HCV	uni	3.0	9.0	G2
18	54	M	HBV	uni	4.0	162	G2
19	69	M	HCV	uni	10	390	G3
20	74	M	None	uni	11	78	G3
21	73	M	HCV	uni	4.5	2	G3
22	77	M	HCV	uni	2.2	48	G2
23	71	F	HCV	uni	2.0	276	G3
24	68	M	HCV	multi	2.5	5.0	G2
25	81	M	HCV	uni	3.0	8.0	G3
26	74	M	HCV	uni	3.5	2198	G2
27	74	M	HCV+HBV	multi	3.0	75	G4
28	82	M	None	multi	5.2	4.0	G3
29	51	M	HBV+HCV	multi	7.0	1924	G3
30	79	M	HCV	multi	10	7.0	G3
31	70	M	HCV	multi	2.3	46	G3
32	72	M	HCV	multi	3.4	18	G3
33	70	M	None	multi	10	11	G2
34	75	M	HCV	multi	7.0	9.0	G3
35	59	M	HCV	multi	3.0	76	G3
36	67	M	None	multi	6.0	18766	G3
37	65	M	HCV	multi	6.5	167	G3
38	76	M	HBV-Ab	multi	5.0	10000	G4
39	49	M	HBV	multi	4.0	2708	G4
40	53	F	HCV	multi	4.0	60	G3
41	62	F	HCV	multi	3.0	468	G2
42	79	M	HBV	multi	7.0	540	G4
43	68	M	HCV	multi	8.0	86	G3
44	65	F	HCV	multi	7.0	139313	G4
45	64	M	HCV+Ethanol	multi	6.5	8	G3
46	60	M	HCV	multi	3.2	15	G2
47	60	M	HCV	multi	1.3	257	G4
48	58	M	HCV	multi	3.0	132	G3

49	66	M	HCV	uni	3.0	58	G2
50	75	M	HCV	multi	3.0	63	G3
51	68	M	HCV	uni	6.5	131	G3
52	66	M	None	uni	15	6	G3
53	70	F	HCV	multi	2.5	3	G3
54	74	F	HBV+HCV	uni	3.0	186	G2
55	69	F	HCV	uni	3.0	453	G2
56	74	M	HCV+HBV-Ab	uni	3.0	134	G3
57	70	M	HCV+HBV	uni	7.0	500	G4

1) Cause della sottostante patologia epatica: HBV: Virus Epatite B; HCV: Virus Epatite B; BAb: anticorpi contro HBV; Etanolo: storia di abuso di alcol; Criptogenici sono quei casi in cui sono stati esclusi: infezioni virali, abuso di alcol, emocromatosi, patologia di Wilson, deficienza di α 1-anti-tripsina, cirrosi biliare primaria, epatite autoimmune e colangite sclerosante primaria.

2) Uni-o multifocalità è stata assegnata sulla base di tecniche di imaging precedenti l'intervento chirurgico.

3) Dimensioni del nodulo di HCC (cm)

4) Livelli di alfa-feto-proteina sono stati misurati prima dell'intervento.

5) Grado di HCC è stato assegnato attraverso i criteri di Edmonson e Steiner's (74).

3.3 Studio del ruolo biologico del microRNA-221: regolazione di CDKN1C/p57 e CDKN1B/p27 in linee cellulari di epatocarcinoma

Tra i 35 microRNA deregolati nei tessuti di HCC abbiamo successivamente studiato il microRNA-221. Il miR-221 è infatti uno dei pochi microRNA della *signature* ad essere sovra-espresso nel tessuto tumorale rispetto al circostante fegato cirrotico, dato che ha fatto ipotizzare ad un ruolo attivo di questo microRNA nel processo di epatocarcinogenesi. Inoltre, un aumento dell'espressione del miR-221 era stata osservata anche in altri tipi di tumore umano quali glioblastoma (95), cancro della vescica (96), tumore papillare della tiroide (97) e cancro del pancreas (98), supportando ulteriormente il ruolo pro-oncogenico di questo microRNA nel processo di tumorigenesi. In aggiunta, la sovra-espressione del miR-221 era stata precedentemente associata all'aumentata proliferazione di cellule cancerose, probabilmente attraverso la sua capacità di regolare la proteina oncogenica c-kit (76) e l'inibitore delle cinasi-ciclina dipendenti CDKN1B/p27 (99-102), un importante controllore del ciclo cellulare.

Allo scopo di studiare il ruolo del miR-221 nel processo di epatocarcinogenesi ed al fine di individuare ipotetici geni bersaglio, abbiamo eseguito un'analisi bioinformatica utilizzando gli algoritmi miRanda, TargetScan e PicTar. Da tale analisi, entrambi gli mRNA di CDKN1B/p27 e CDKN1C/p57 sono stati predetti da almeno due degli algoritmi utilizzati come ipotetici geni bersaglio del miR-221; infatti, entrambi presentano uno o più siti complementari alla sequenza del miR-221 nelle loro regioni 3'UTR.

Dati di letteratura riportano la sotto-espressione di CDKN1B/p27 nei tessuti di HCC quando confrontati con il circostante tessuto cirrotico. Inoltre, la diminuita

espressione di CDKN1B/p27 mostra un rilevante significato prognostico nell'epatocarcinoma umano, essendo associata ad uno stadio tumorale avanzato, a diminuita sopravvivenza ed insorgenza di recidiva epatica (103). La sotto-espressione di CDKN1C/p57 nell'HCC è stata anch'essa correlata ad un fenotipo tumorale a più elevata aggressività biologica, a stadi tumorali più avanzati, ad uno scarso differenziamento, a presenza di invasione portale ed elevata attività proliferativa. Inoltre, un basso indice di espressione di CDKN1C/p57 è stato associato ad una prognosi peggiore e ad un diminuito tempo di sopravvivenza in pazienti curativamente trattati per HCC; suggerendo che la sotto-espressione di CDKN1C/p57 potrebbe contribuire alla progressione dell'epatocarcinoma attraverso la modulazione della crescita cellulare (104, 105). Il nostro ed altri gruppi di ricerca hanno recentemente riportato che circa il 26% degli HCC mostrano una perdita della metilazione dell'allele materno nel locus soggetto ad imprinting, KvDMR1, situato nel cromosoma 11p15.5 dove si trova il gene CDKN1C/p57 (106, 107), e che tale meccanismo è coinvolto nella riduzione dell'espressione di CDKN1C/p57 (108). Nonostante questo, in una casistica non selezionata di HCC, abbiamo osservato una riduzione dei livelli di CDKN1C/p57 nell'80% dei casi di HCC, dato che fa ipotizzare all'esistenza di altri meccanismi molecolari implicati nella regolazione di CDKN1C/p57 nell'epatocarcinoma umano, oltre all'aberrante metilazione genica. Dal momento che la predizione bioinformatica ha indicato CDKN1C/p57 come possibile bersaglio del miR-221, in questo lavoro di tesi abbiamo investigato la regolazione dei due inibitori del ciclo cellulare CDKN1C/p57 e CDKN1B/p27 da parte del miR-221.

Alla luce di questi dati, per caratterizzare la regolazione dei due inibitori del ciclo cellulare da parte del miR-221 abbiamo analizzato tramite Northern blot

l'espressione del miR-221 in tre linee cellulari derivate da HCC (Hep3B, SNU398 e SNU449). Nelle stesse linee cellulari abbiamo successivamente investigato, tramite Western blot ed RT-PCR, i livelli di espressione dei due target molecolari, CDKN1B/p27 e CDKN1C/p57 (**Figura 23**). Questa analisi ha mostrato una correlazione inversa tra i livelli di espressione del miR-221 ed i livelli proteici di entrambi i geni target, mentre non è stata rivelata alcuna correlazione tra il miR-221 e l'espressione dell'mRNA dei due bersagli molecolari. Tali osservazioni fanno ipotizzare ad una regolazione di tipo post-trascrizionale, ed in particolare al blocco della traduzione, da parte del miR-221 sui due geni bersaglio.

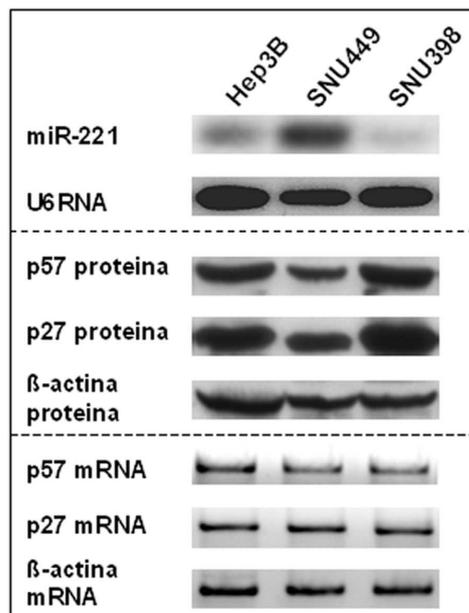


Figura 23. Correlazione inversa tra miR-221 e ipotetici geni target, CDKN1C/p57 e CDKN1B/p27. Analisi di Northern blot del miR-221 in tre linee cellulari di HCC. Il gene U6RNA è stato utilizzato come housekeeping. Analisi di Western blot ed RT-PCR di CDKN1C/p57 e CDKN1B/p27 nelle stesse tre linee di HCC. La β-actina è stata utilizzata come gene housekeeping per la normalizzazione sia dei livelli proteici che di mRNA.

Per quel che riguarda la successiva analisi funzionale *in vitro*, abbiamo selezionato la linea cellulare Hep3B sia per l'over-espressione che per il silenziamento del miR-221, in quanto tale linea esprime livelli intermedi di miR-221 rispetto alle altre linee analizzate insieme a livelli piuttosto elevati dei due ipotetici geni bersaglio. La trasfezione del miR-221 nelle cellule Hep3B ha determinato una diminuzione di 1.8 e 2.6 volte delle bande corrispondenti a CDKN1C/p57 e CDKN1B/p27, rispettivamente, quando confrontate con le cellule trasfettate con il solo controllo negativo (Negative Control #1 precursor miRNAs) (**Figura 24A**). Al contrario, le cellule Hep3B trasfettate con l'anti-miR-221 hanno mostrato un incremento di 1.9 e 1.4 volte nei livelli di espressione di CDKN1C/p57 e CDKN1B/p27, rispettivamente, se paragonate alle cellule trattate con il controllo negativo (Negative Control #1 miRNA inhibitors) (**Figura 24B**). Inoltre, l'over-espressione del miR-221 è stata effettuata anche sulla linea cellulare SNU398, la quale esprime livelli basali molto bassi di miR-221 ed alti livelli proteici di CDKN1C /p57 e CDKN1B/p27. La trasfezione del miR-221 nelle cellule SNU398 ha portato ad una diminuzione di 3.4 e 1.9 volte dei livelli di espressione di CDKN1C/p57 e CDKN1B/p27, rispettivamente, quando confrontate con le cellule trattate con il controllo negativo (**Figura 24C**). Il silenziamento del miR-221 non è stato eseguito sulla linea SNU398 in quanto essa esprime livelli costitutivi di miR-221 molto bassi. Abbiamo invece eseguito il silenziamento del miR-221 nella terza linea cellulare testata, SNU449, la quale esprime livelli costitutivi di miR-221 molto elevati insieme a bassi livelli dei due inibitori delle cicline-cinasi dipendenti (CDKI). Le cellule SNU449 trasfettate con l'anti-miR-221 hanno mostrato un incremento di 1.3 e 2.0 volte nei livelli proteici di CDKN1C/p57 e CDKN1B/p27, rispettivamente (**Figura 24D**).

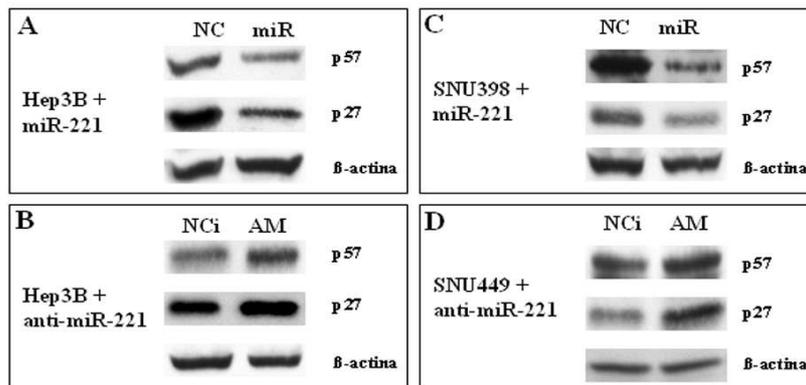


Figura 24. Il miR-221 regola CDKN1C/p57 e CDKN1B/p27 in linee cellulari di HCC. (A) Analisi di Western blot di CDKN1C/p57 e CDKN1B/p27 nelle cellule Hep3B trasfettate col miR-221. NC: Negative Control #1 precursor miRNAs; miR: miR-221. (B) Analisi di Western blot di CDKN1C/p57 e CDKN1B/p27 nelle cellule Hep3B trasfettate con anti-miR-221. NCi: Negative Control #1 inhibitor miRNAs; AM: anti-miR-221. (C) Analisi di Western blot di CDKN1C/p57 e CDKN1B/p27 nelle cellule SNU398 trasfettate col miR-221. (D) Analisi di Western blot di CDKN1C/p57 e CDKN1B/p27 nelle cellule SNU449 trasfettate con anti-miR-221. La β -actina è stata utilizzata come gene housekeeping.

Poichè la regolazione di CDKN1B/p27 da parte del miR-221 era già stata dimostrata in altri tipi di tumore umano (99-102), abbiamo focalizzato la nostra attenzione nello studio dell'interazione tra miR-221 e CDKN1C/p57. Per dimostrare il legame diretto del miR-221 al sito complementare presente nella regione 3'UTR dell'RNA messaggero di CDKN1C/p57 (**Figura 25A**), abbiamo clonato una porzione (295 bp) del 3'UTR di CDKN1C/p57 a valle del gene reporter contenuto nel vettore pGL3. Il vettore così costruito è stato nominato pGL3-p57 ed è stato utilizzato in esperimenti di co-trasfezione con miR-221, anti-miR-221 o controlli negativi nelle linee cellulari Hep3B e SNU449. Il vettore pRL-TK, contenente il gene di luciferasi di Renilla è stato utilizzato per normalizzare le differenze nell'efficienza di trasfezione. L'attività luciferasica nelle cellule Hep3B co-trasfettate con il vettore pGL3-p57 ed il miR-221 è risultata diminuita del 29% quando paragonata con il Negative Control#1 miRNA

precursors (NC) ($p=0.001$, t-test) (**Figura 25B**). Al contrario, l'attività luciferasica del vettore pGL3-p57 nella linea SNU449 in seguito a co-trasfezione con anti-miR-221 è risultata aumentata del 27%, quando paragonata con Negative Control #1 miRNA inhibitors (NCi) ($p=0.0008$ at t-test) (**Figura 25B**). Presi insieme, i dati di immunoblot e di saggio di luciferasi dimostrano che i due inibitori del ciclo cellulare, CDKN1C/p57 e CDKN1B/p27, sono direttamente regolati dal miR-221 in linee cellulari di epatocarcinoma.

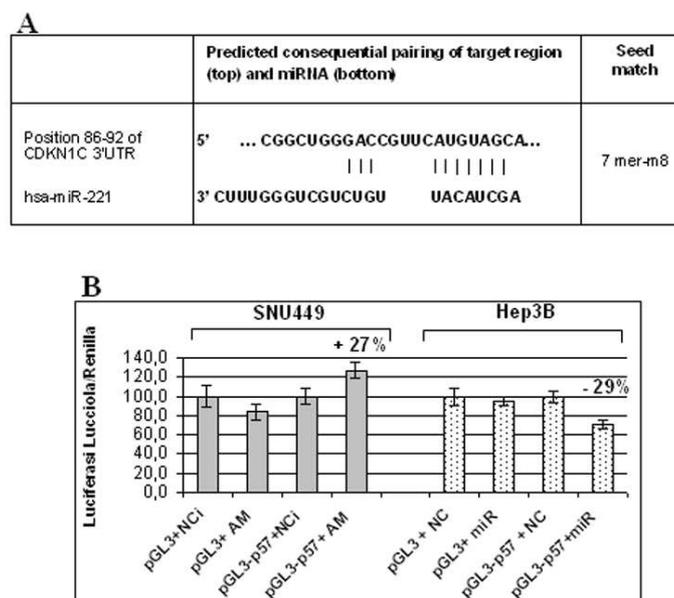


Figura 25. Regolazione diretta di CDKN1C/p57 mRNA da parte del miR-221. (A) Sito complementare al miR-221 in CDKN1C/p57 3'UTR, come predetto dall'algoritmo TargetScan. (B) Saggio di luciferasi in cellule Hep3B e SNU449 trasfettate con miR-221, anti-miR-221 e controlli negativi. NCI: Negative Control #1 inhibitor miRNAs; AM: anti-miR-221; NC: Negative Control #1 precursor miRNAs; miR: miR-221. Ogni campione è stato analizzato in triplicato in due esperimenti differenti. Colonne: valore medio; Barre: deviazione standard.

3.3.1 Il microRNA-221 regola il ciclo cellulare e la crescita in linee cellulari di epatocarcinoma

Poichè i due bersagli molecolari del miR-221 sono proteine coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare, ed in particolare nella transizione G1/S, abbiamo analizzato il ruolo del miR-221 nella regolazione della crescita e del ciclo cellulare in linee cellulari derivate da HCC. Dopo 24, 48 e 72h dalla trasfezione con miR-221 o anti-miR-221, le cellule Hep3B sono state raccolte e contate con camera di Burker. A 72h dalla trasfezione, l'over-espressione del miR-221 ha determinato un incremento della crescita cellulare di 1.3 volte rispetto alle cellule trasfettate con il controllo negativo ($p=0.011$, t-test), mentre il silenziamento del miR-221 ha causato una diminuzione di 1.5 volte nel numero di cellule quando confrontato con il controllo negativo ($p=0.003$, t-test) (**Figura 26A**). Per confermare tale dato, abbiamo eseguito lo stesso esperimento su di una seconda linea di HCC, le SNU398, la quale è stata utilizzata per l'over-espressione del miR-221, dal momento che esprime livelli basali molto bassi di tale microRNA. Dopo 24 e 48h dalla trasfezione del miR-221 è stato registrato un incremento nel numero di cellule di 1.5 ($p=0.002$, t-test) e 1.4 volte ($p=0.0006$, t-test), rispettivamente, in confronto alle cellule trattate con un oligonucleotide di controllo (**Figura 26B**). A 72h dalla trasfezione, l'incremento della crescita cellulare delle cellule SNU398 trasfettate con il miR-221 risulta meno evidente, probabilmente a causa del raggiungimento della confluenza cellulare all'interno del pozzetto.

In seguito abbiamo eseguito un'analisi citofluorimetrica per investigare la distribuzione delle cellule Hep3B nelle diverse fasi del ciclo cellulare in seguito a

trasfezione con il miR-221. Tale analisi ha rivelato un incremento significativo della popolazione cellulare nella fase S (1.8 volte; $p=0.005$, t-test) nelle cellule trasfettate col miR-221 rispetto a quello trasfettate con un controllo negativo. Una concomitante diminuzione delle cellule in fase G1 è stata osservata nelle cellule over-esprimenti il miR-221 (**Figura 26C**).

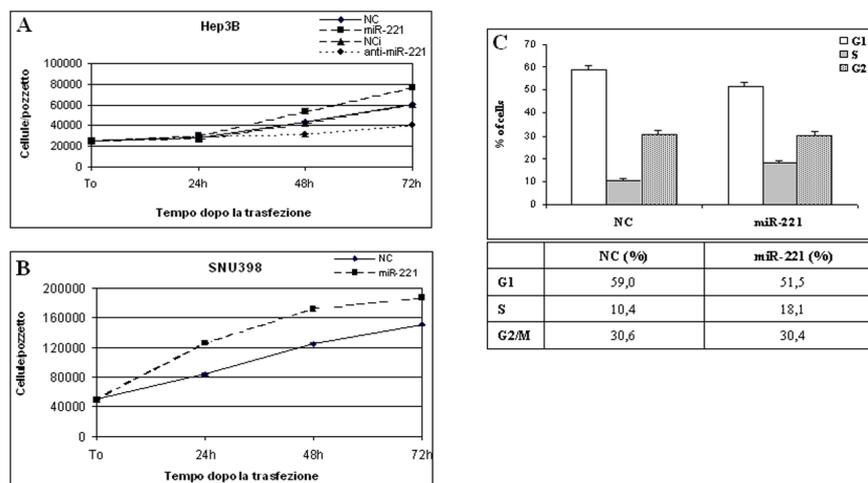


Figura 26. Il miR-221 regola la crescita cellulare di linee cellulari di HCC. (A) Curva di crescita delle cellule Hep3B dopo trasfezione con miR-221 e anti-miR-221. NCI: Negative Control #1 inhibitor miRNAs; AM: anti-miR-221; NC: Negative Control #1 precursor miRNAs; miR: miR-221. (B) Curva di crescita delle cellule SNU398 dopo trasfezione con miR-221. Ogni dato è stato ottenuto in triplicato. In grafico sono mostrati i valori medi più le deviazioni standard di ogni punto della curva. (C) Analisi del ciclo cellulare nella linea Hep3B dopo 72h dalla trasfezione con miR-221. Ogni dato è stato ottenuto in duplicato. Colonne: valore medio; Barre: deviazione standard.

3.3.2 Correlazione inversa tra il microRNA-221 e i due target molecolari in pazienti con epatocarcinoma

I pazienti appartenenti alla casistica analizzata in questo studio sono stati selezionati sulla base dei livelli mRNA della proteina CDKN1C/p57. Ovvero, sono stati selezionati solo quei pazienti che mostravano livelli di mRNA simili tra il tessuto proveniente da HCC e quello proveniente dal fegato cirrotico circostante il nodulo. Questo per evitare quel 25-30% di casi di HCC che mostrano un'aberrante mutazione del promotore del gene CDKN1C/p57. Tra i 39 casi selezionati inizialmente, solo 35 casi sono stati selezionati per l'analisi di correlazione tra miR-221 ed i suoi geni target, in quanto esprimevano livelli molto simili di mRNA di CDKN1C/p57 tra HCC e fegato cirrotico. Ventisette dei 35 casi (77%) hanno mostrato una sotto-espressione della proteina CDKN1C/p57; una selezione dei casi è riportato in Figura 27A. Per dimostrare l'esistenza di una correlazione inversa tra l'espressione del miR-221 ed i livelli delle proteine CDKN1B/p27 e CDKN1C/p57 nei campioni di HCC, abbiamo eseguito un'analisi di Real time PCR per la quantificazione del miR-221 ed un'analisi di Western blot per la quantificazione dei due CDKI nei 35 tessuti accoppiati di HCC e fegato cirrotico (CE). Come mostrato in Figura 27B e C, quando i livelli proteici di CDKN1C/p57 and CDKN1B/p27 sono stati graficati contro i livelli di miR-221, è stata osservata una correlazione inversa tra i due parametri. Nessuna associazione è stata individuata tra i livelli di miR-221 e le cause della cirrosi sottostante il nodulo tumorale, in particolare con le infezioni virali, né con il sesso, il grado istopatologico ed i livelli di AFP.

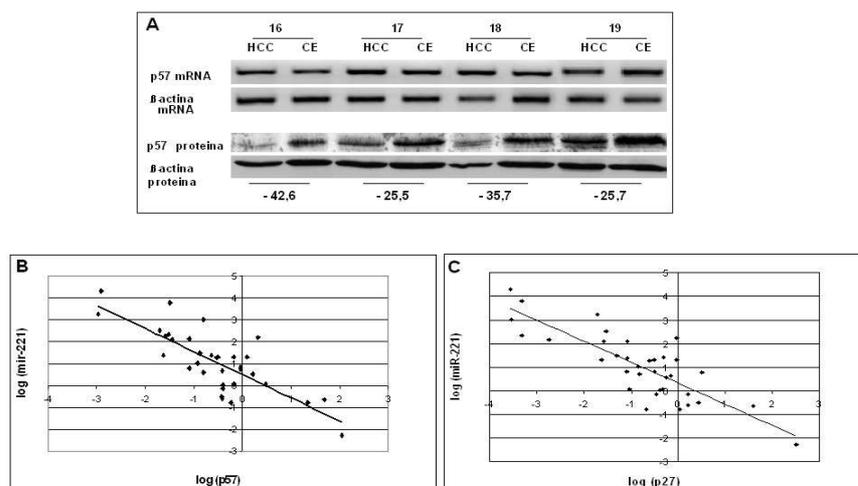


Figura 27. Correlazione inversa tra il miR-221 e i due CDKI in campioni d HCC. (A) Livelli di mRNA e proteina di CDKN1C/p57 in tessuti di HCC e circostrante fegato cirrotico (CE). Casi rappresentativi analizzati tramite RT-PCR e Western blot. La β -actina è stata utilizzata come gene housekeeping sia a livello di mRNA che di proteina. I casi sono numerati in accordo alla Tabella 20. (B) Correlazione inversa tra miR-221 e CDKN1C/p57 e (C) miR-221 e CDKN1B/p27 in tessuti di HCC. Ogni dato derivante da campioni di HCC è stato normalizzato con il valore della rispettiva cirrosi ed espresso in forma logaritmica (\log_2). Una correlazione statisticamente significativa tra il miR-221 ed i livelli proteici di CDKN1B/p27 e CDKN1C/p57 è stata osservata ($p < 0.001$ per entrambi i CDKI) usando il two-tailed Pearson test.

Tabella 20. Caratteristiche dei pazienti con HCC analizzati nello studio del miR-221 e dei due inibitori del ciclo cellulare, CDKN1B/p27 e CDKN1C/p57.

N.	Età	Genere	Etiology (1)	Focalità (2)	Dimensioni (cm) (3)	AFP (ng/mL) (4)	Grado (5)
1	80	F	HCV	uni	5	76	G3
2	70	M	HCV	multi	2.3	46	G3
3	70	M	HCV	uni	4.8	95	G3
4	82	F	HCV	uni	7.5	67	G2
5	65	M	HCV+Ethanol	uni	3	19.6	G3
6	75	M	HCV	multi	5.4	9	G2
7	59	M	HCV+BAb	multi	3.8	10	G3
8	68	M	HCV	multi	2.5	5	G2
9	68	F	HCV	uni	3	9	G3
10	77	M	BAb	uni	5	4	G3
11	81	M	HCV	uni	3	210	G3
12	65	M	HBV+Ethanol	uni	3	5	G2
13	82	M	None	multi	5.2	4	G2
14	74	M	HCV+HBV	multi	3.4	75	G4
15	74	M	HCV	uni	3.5	2198	G3
16	60	M	Ethanol	uni	1.8	121	G2
17	76	M	HBV	multi	5	10000	G3
18	75	M	None	multi	15	6	G3
19	78	M	HCV	uni	3	9	G2
20	60	M	HCV	multi	1.3	257	G4
21	74	M	None	uni	11	78	G3
22	69	M	HCV	multi	10	7	G3
23	65	M	HCV	multi	6.5	167	G3
24	68	F	None	uni	5.5	2	G3
25	70	M	None	multi	10	11	G2
26	64	F	HCV	multi	3	148	G3
27	59	M	HCV	uni	5	86	G3
28	75	M	HCV	multi	3	63	G3
29	73	M	HCV	uni	4.5	2	G3
30	82	M	None	multi	5	4	G3
31	59	F	HCV	uni	6	7	G4
32	51	M	HBV+HCV	multi	7	1924	G3
33	78	M	HCV	multi	4	7	G2
34	66	F	HCV	uni	8	9572	G3
35	67	M	None	multi	6	18766	G3
36	68	F	HCV	uni	4	436	G3
37	67	M	HCV	multi	3.5	9	G3
38	78	M	None	multi	5.5	7	G4
39	71	M	HCV	uni	2.5	69	G2

1) Cause della sottostante patologia epatica: HBV: Virus Epatite B; HCV: Virus Epatite B; BAb: anticorpi contro HBV; Etanolo: storia di abuso di alcol; Criptogenici sono quei casi in cui sono stati esclusi: infezioni virali, abuso di alcol, emocromatosi, patologia di Wilson, deficienza di α 1-anti-tripsina, cirrosi biliare primaria, epatite autoimmune e colangite sclerosante primaria.

2) Uni-o multifocalità è stata assegnata sulla base di tecniche di imaging precedenti l'intervento chirurgico.

3) Dimensioni del nodulo di HCC (cm)

4) Livelli di alfa-feto-proteina sono stati misurati prima dell'intervento.

5) Grado di HCC è stato assegnato attraverso i criteri di Edmonson e Steiner's (74).

3.3.3 Il microRNA-221 regola l'espressione di Bmf in linee cellulari di epatocarcinoma

Allo scopo di caratterizzare ulteriormente il ruolo del miR-221 nel processo di epatocarcinogenesi, abbiamo focalizzato la nostra attenzione sullo studio di molecole coinvolte nel processo di apoptosi. Infatti, l'equilibrio tra segnali proliferativi e segnali pro-apoptotici è stato ampiamente studiato in patologie epatiche, dove il programma di morte programmata può essere attivato sia attraverso il coinvolgimento del recettore Fas(CD95) che dei membri della famiglia di Bcl-2 (109-111). A questo riguardo, l'analisi bioinformatica ha consentito di individuare tra i target del miR-221 la proteina Bmf (Bcl-2 modifying factor), un membro pro-apoptotico appartenente alla famiglia di Bcl-2. Tale famiglia proteica è composta sia da membri anti-apoptotici (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 e A1) che da membri pro-apoptotici comprendenti il gruppo di Bax/Bak ed il gruppo delle proteine contenenti il dominio BH3 (Bmf, Bim, Bad, Bik, Puma, Noxa e Hrk). Quest'ultimo gruppo di proteine monitora il benessere cellulare e, quando attivato da segnali extra-cellulari, sequestra i membri anti-apoptotici della famiglia di Bcl-2 inattivandone la loro funzione e promuovendo l'attivazione della morte cellulare per apoptosi. Inoltre, i membri con dominio BH3 giocano un ruolo chiave nello sviluppo, nell'omeostasi tissutale, nell'immunità e nella soppressione tumorale; composti che mimano le funzioni di questo gruppo di proteine risultano perciò promettenti agenti anti-tumoralmente (112). La proteina Bmf è normalmente sequestrata dal complesso della miosina V e della catena leggera della dineina 2; tale localizzazione citoscheletrica potrebbe essere fondamentale per la risposta a stimoli extra-cellulari e la successiva induzione

dell'apoptosi. In seguito ad eventi stressanti come il distacco delle cellule dalla matrice extra-cellulare e l'esposizione ad irradiazioni UV, Bmf è rilasciata dal complesso citoscheletrico nel citoplasma, dove può legarsi a membri anti-apoptotici della famiglia di Bcl-2 ed attivare la cascata delle caspasi e conseguente morte cellulare (113). La proteina Bmf è stata individuata in molti organi, con livelli abbondanti nel pancreas, rene, fegato e tessuto ematopoietico. Al momento nessun dato di letteratura è disponibile a riguardo dell'espressione di Bmf nell'epatocarcinoma umano. In questo lavoro di tesi abbiamo quindi investigato la regolazione di Bmf da parte del miR-221 ed il ruolo del miR nella regolazione di pathway pro-apoptotici.

Il sito del miR-221 nel 3'UTR di Bmf risulta molto conservato tra le varie specie animali ed è riconosciuto da tutti e tre gli algoritmi utilizzati (miRanda, TargetScan e Pictar) (**Figura 28A**). Un'ulteriore prova a favore del potenziale ruolo del miR-221 nella regolazione di Bmf è data dall'analisi di linee cellulari di HCC (HepG2, Hep3B, SNU398 and SNU449), le quali mostrano una correlazione inversa tra i livelli di miR-221 ed i livelli della proteina Bmf. Il fatto che non vi sia una correlazione tra miR-221 e Bmf mRNA fa ipotizzare ad una regolazione di tipo post-trascrizionale, blocco della traduzione, da parte del miR-221 (**Figura 28B-E**).

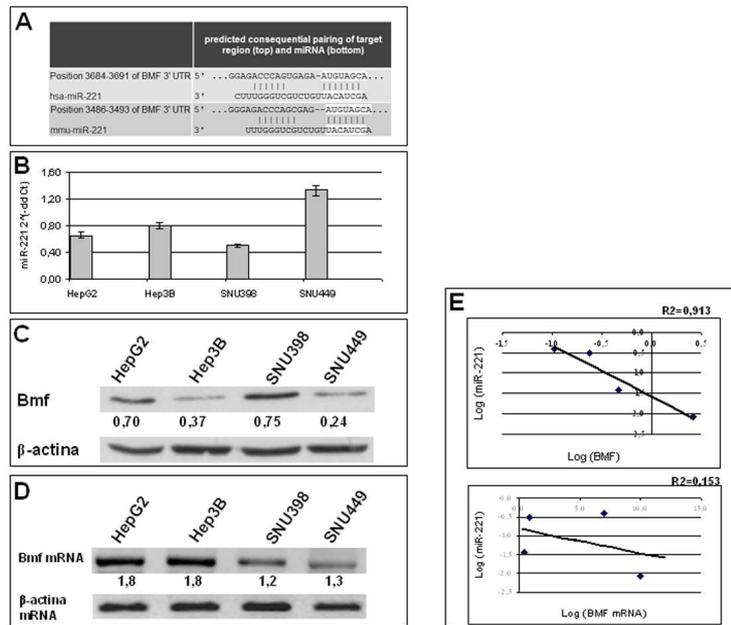


Figura 28. Sito del miR-221 nel 3'UTR di Bmf ed analisi di linee cellulari di HCC. (A) Sito di legame del miR-221 nel 3'UTR dell'mRNA di Bmf, come predetto dall'algoritmo TargetScan. (B) Analisi di Real time PCR del miR-221 in linee di HCC. Il gene U6RNA è stato utilizzato come housekeeping. (C, D) Analisi di Western blot ed RT-PCR di Bmf in linee cellulari di HCC. La β -actina è stata utilizzata come gene housekeeping. I valori rappresentano il rapporto tra Bmf e la β -actina. (E) Correlazione inversa tra miR-221 e Bmf proteina e tra miR-221 e Bmf RNA nelle linee di HCC. I valori di miR-221 e Bmf sono stati espressi in forma logaritmica (log2).

Per verificare che il miR-221 regolasse i livelli di espressione di Bmf, abbiamo eseguito un'analisi funzionale *in vitro* su linee di HCC. In particolare, abbiamo selezionato la linea Hep3B sia per l'over-espressione che per il silenziamento del miR-221, in quanto esprime, tra linee analizzate in questo studio, livelli intermedi di miR-221 e bassi livelli della proteina Bmf. Dopo la trasfezione con il miR-221 abbiamo osservato una diminuzione di 1.5 volte dei livelli di Bmf, mentre in seguito al silenziamento del miR-221 è stato osservato un incremento di 1.8 volte dell'espressione di tale proteina (**Figura 29A**). Per confermare tale dato, abbiamo selezionato la linea SNU398 la quale esprime

livelli costitutivi molto bassi di tale microRNA insieme ad alti livelli della proteina Bmf, per eseguire l'over-espressione del miR-221. La trasfezione del miR-221 in tale linea ha portato ad una diminuzione di 1.9 volte nei livelli di espressione della proteina Bmf (**Figura 29A**). Al contrario la linea SNU449 è stata selezionata per il silenziamento del miR-221 in quanto esprime i più alti livelli di miR-221 ed i più bassi livelli di Bmf. La trasfezione con l'anti-miR-221 ha determinato un aumento di 2.5 volte dei livelli di espressione della proteina Bmf, quando paragonata con la trasfezione di un controllo negativo (**Figura 29A**).

Successivamente, per dimostrare la presenza di interazione diretta tra miR-221 e Bmf mRNA, abbiamo clonato una porzione del 3'UTR di Bmf a valle di un gene reporter nel vettore pGL3 (pGL3-BMF). Tale vettore è stato co-trasfettato nella linea Hep3B insieme al miR-221, all'antimiR-221 o a controlli negativi. L'attività di luciferasi del vettore pGL3-Bmf è risultata significativamente diminuita in presenza di miR-221 ($p=0.0001$, t-test) e significativamente aumentata in presenza di anti-miR-221 ($p=0.00001$ at t-test), quando paragonata con cellule co-trasfettate con il controllo negativo (**Figura 29B**). Presi insieme, questi dati dimostrano che Bmf è un bersaglio diretto del miR-221 in linee cellulari di HCC.

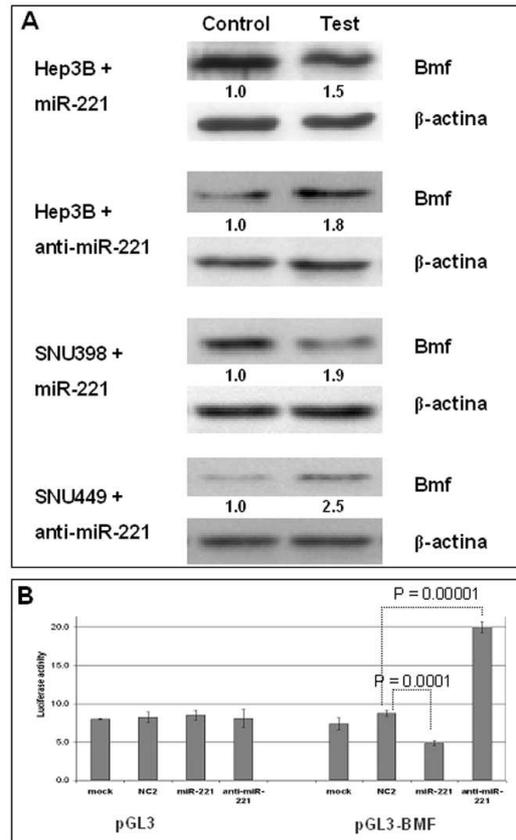


Figura 29. Bmf è un bersaglio diretto del miR-221. (A) Esperimenti di trasfezione ed analisi di Western blot nelle linee Hep3B, SNU3398 e SNU449. Control: miRNA Negative Controls; Test: miR-221 o anti-miR-221 come indicato. β -actina è stata utilizzata come gene housekeeping. I valori rappresentano il rapporto tra Bmf e la β -actina. (B) Saggio di luciferasi nelle cellule Hep3B trasfettate con miR-221, anti-miR-221 e controllo negativo. Ogni campione è stato analizzato in triplicato in due esperimenti differenti. Colonne: valore medio; Barre: deviazione standard.

3.3.4 Il microRNA-221 è sovra-espresso in condizioni di non-adesione alla matrice extra-cellulare e induce apoptosi tramite l'inibizione di Bmf

Dati di letteratura dimostrano che la proteina Bmf è coinvolta in uno specifico tipo di morte cellulare indotta in seguito a distacco delle cellule dalla matrice extra-cellulare (ECM), tale processo è noto come 'anoikis'(114). Per saggiare il ruolo del miR-221 in condizioni di sospensione cellulare, le piastre colturali sono state trattate con il polimero Polyhema per 24h a 37°C, tale polimero impedisce

l'adesione delle cellule alla piastra. La linea cellulare SNU449 è stata trasfettata per 24h con l'anti-miR-221 o con un controllo negativo e successivamente le cellule sono state coltivate in condizioni di sospensione per altre 24h. La conta delle cellule apoptotiche è stata effettuata con Trypan Blue in camera di Burker. Dopo 24 e 48h di crescita in condizioni di sospensione cellulare, è stato osservato un incremento di 1.4 e 2.0 volte nel numero di cellule morte nelle cellule trasfettate con l'anti-miR-221 rispetto a quelle trattate con il controllo negativo ($p < 0.001$, t-test per entrambi i tempi) (**Figura 30A**). Per caratterizzare più nel dettaglio tale processo apoptotico, abbiamo eseguito un'analisi di Western blot di alcuni marcatori apoptotici sulle cellule SNU449 trattate con anti-miR-221 e cresciute in sospensione per 24h. Le cellule silenziate per il miR-221 hanno mostrato un incremento di 1.7 volte sia nei livelli di espressione di Bmf che di Caspasi 3 attivata, quando confrontate con le cellule trattate con un controllo negativo (**Figura 30B**). Per dimostrare che il miR-221 induce morte cellulare in condizioni di non-adesione specificatamente attraverso l'azione di Bmf, abbiamo eseguito il silenziamento di Bmf utilizzando un pool di siRNA nelle cellule SNU449. Ventiquattro ore dopo la trasfezione dell'anti-miR-221, abbiamo eseguito il silenziamento di Bmf per altre 24h e successivamente trasferito le cellule in una piastra trattata con polyhema. Il silenziamento di Bmf in seguito a trattamento con anti-miR-221 ha causato una diminuzione significativa dei livelli di Caspasi 3 attivata (isoforma di 17 kDa) rispetto alle cellule trattate con solo l'anti-miR-221 (**Figura 30C**). Presi insieme, questi dati dimostrano chiaramente che il miR-221 regola il processo di morte cellulare in condizioni di non-adesione attraverso l'inibizione di Bmf.

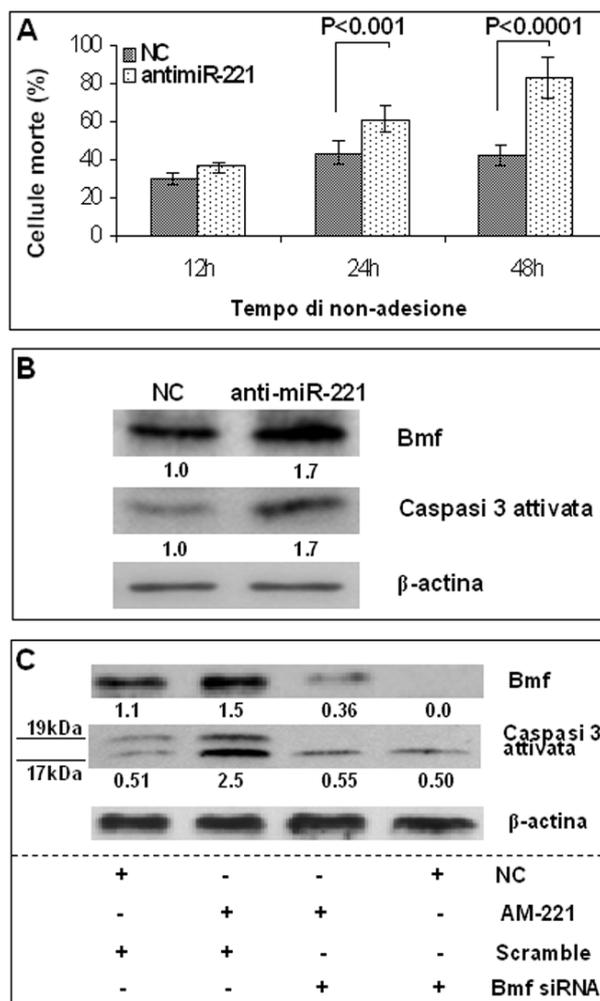


Figura 30. L'anti-miR-221 aumenta la suscettibilità all'apoptosi della linea SNU449 in condizioni di non-adesione. (A,B) Conta cellulare con Trypan Blue ed analisi di Western blot in cellule SNU449 trasfettate con anti-miR-221 e controllo negativo (NC) e cresciute in condizioni di non-adesione. (C) In condizioni di sospensione cellulare il silenziamento del miR-221 seguito dal silenziamento di Bmf determina una diminuzione dell'attivazione della Caspasi 3. La β -actina è stata utilizzata come gene housekeeping. I valori rappresentano il rapporto tra Bmf o Caspasi 3 e la β -actina.

Successivamente, abbiamo investigato l'espressione del miR-221 e del suo gene target Bmf in condizioni di non-adesione cellulare nella linea SNU449. L'analisi di Real time PCR ha mostrato un progressivo aumento dei livelli di miR-221 con un picco massimo a 24h dalla sospensione cellulare (**Figura 31A**). Tale aumento è risultato direttamente proporzionali ai livelli di Bmf mRNA

(Figura 31B), ma inversamente proporzionale ai livelli di Bmf proteina (Figura 31C). Inoltre, l'attivazione della Caspasi 3 è avvenuta solo a 48h dalla sospensione cellulare quando i livelli di miR-221 cominciavano a diminuire consentendo la traduzione dell'mRNA di Bmf. Tali dati dimostrano che, anche in condizioni di non-adesione alla matrice extra-cellulare, il miR-221 è in grado di regolare l'espressione della proteina Bmf e che quest'ultima è determinante nell'attivazione della Caspasi 3 e quindi nell'induzione del processo di morte cellulare per apoptosi.

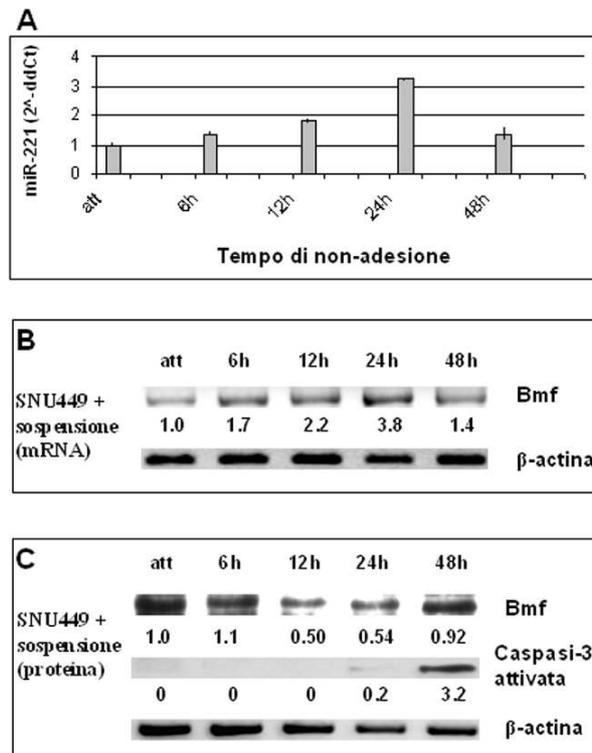


Figura 31. L'espressione del miR-221 aumenta in condizioni di non-adesione e regola Bmf. (A) Analisi di Real time PCR del miR-221 in condizioni di non-adesione. (B) Analisi di RT-PCR di Bmf in condizioni di non-adesione. (C) Analisi di Western blot di Bmf e Caspasi 3 attivata in condizioni di non-adesione. La β-actina è stata utilizzata come gene housekeeping per la normalizzazione sia dei livelli di mRNA che di proteina. I valori rappresentano il rapporto tra Bmf o Caspasi 3 e la β-actina.

3.3.5 Ruolo prognostico del microRNA-221: correlazione con la focalità del tumore ed il tempo di insorgenza di recidiva epatica in pazienti chirurgicamente trattati per epatocarcinoma

Per valutare il significato della correlazione tra miR-221 e Bmf in tumori primari di HCC, l'espressione del miR-221 è stata analizzata tramite Real time PCR in 51 campioni di HCC e circostrante fegato cirrotico ed è risultata aumentata nel 70% dei campioni di HCC. L'espressione della proteina Bmf è stata valutata tramite analisi di Western blot in 27 dei 51 campioni di HCC, selezionati sulla base della disponibilità del tessuto. In linea con i dati ottenuti *in vitro*, nei campioni di HCC è stata osservata una correlazione inversa tra i valori di miR-221 e quelli del suo gene target Bmf (Pearson's test: $p=0.003$) (**Figura 32A**). Inoltre, allo scopo di investigare la funzione biologica di Bmf nei campioni di HCC, gli stessi campioni biologici sono stati analizzati tramite Western blot per testare l'attivazione della Caspasi 3, utilizzata come marcatore di apoptosi. Una correlazione inversa statisticamente significativa è stata individuata tra Bmf e Caspasi 3 attivata (Pearson's correlation, $p<0.0001$) (**Figura 32B**); tale dato fa supporre ad un possibile coinvolgimento della proteina Bmf nel processo pro-apoptotico *in vivo*. Al contrario non è stata trovata alcuna correlazione tra miR-221 e Caspasi 3 attivata. Quest'ultimo dato potrebbe essere spiegato dal fatto che il miR-221 non è l'unico fattore in grado di regolare l'espressione di Bmf e che quest'ultimo non è l'unico fattore pro-apoptotico in grado di scatenare l'attivazione della cascata delle caspasi. Perciò, *in vivo* risulta molto difficile trovare una correlazione diretta tra miR-221 e attivazione della Caspasi-3, essendo probabilmente il network molecolare molto più complesso; ulteriori studi

saranno quindi necessari per caratterizzare più a fondo il ruolo del miR-221 nel processo di morte cellulare per apoptosi nei campioni di HCC.

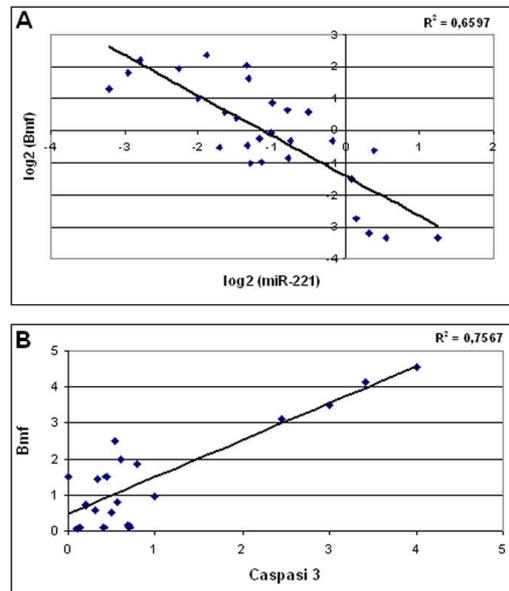


Figura 32. Analisi dell'espressione del miR-221, Bmf e Caspasi 3 attivata in campioni di HCC. (A) Il miR-221, analizzato tramite Real-Time PCR, correla in maniera inversamente proporzionale con l'espressione di Bmf, analizzata tramite Western blot, in campioni di HCC. Ogni dato derivante da campioni di HCC è stato normalizzato con il valore della rispettiva cirrosi ed espresso in forma logaritmica (log2). (B) L'espressione della proteina Bmf correla direttamente con i livelli di Caspasi 3 attivata in campioni di HCC. Entrambe le molecole sono state saggiate tramite Western blot. La β -actina è stata utilizzata come gene housekeeping.

In aggiunta, poichè la deregolazione dell'apoptosi gioca un ruolo cruciale nello sviluppo e nella progressione tumorale dell'epatocarcinoma, abbiamo investigato la presenza di possibili correlazioni tra i livelli di miR-221 o di Bmf con le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti sottoposti a resezione chirurgica per HCC. Da tale analisi statistica è emersa una correlazione tra alti livelli di miR-221 e HCC di natura multi-focale rispetto a quelli uni-focali ($p=0.009$, t-test). In linea con questo dato, l'espressione di Bmf è risultata più

bassa in tumori multi-focali rispetto a quelli uni-focali ($p=0.01$, t-test). Gli alti livelli di Bmf osservati negli HCC uni-focali e la correlazione con l'attivazione della Caspasi 3 possono far supporre ad un coinvolgimento di Bmf nel processo apoptotico e ad un suo ruolo attivo nel processo di metastatizzazione neoplastica. Potremmo quindi speculare che, attraverso l'inibizione di Bmf, alti livelli di miR-221 possano contribuire ad una diminuita velocità di apoptosi, favorendo la selezione di cellule tumorali di natura più aggressiva, con aumentate capacità invasive ed in grado di generare tumori multi-focali.

Dall'analisi di Kaplan-Meier è stata inoltre osservata una correlazione tra pazienti che presentavano una recidiva di HCC entro i due anni dalla resezione epatica con alti livelli di espressione del miR-221 (log-rank test, $p = 0.0009$) (**Figura 33A**), ma non con bassi livelli di Bmf (**Figura 33B**), anche se bassi livelli di Bmf sono associati ad un tendenza verso un minor tempo di insorgenza della recidiva (TTR). Per quel che riguarda la recidiva epatica, il valore soglia di due anni dal giorno dell'intervento è stato scelto in accordo con il lavoro di Imamura *et al*, in quanto tumori epatici che insorgono ad una distanza di tempo superiore ai due anni dalla resezione sono da considerare dei nuovi HCC insorti su fegato cirrotico (115). Il fatto che i livelli di Bmf non correlano in maniera significativa con il TTR potrebbe essere dovuto al basso numero di campioni analizzati per Bmf rispetto a quelli analizzati per il miR-221 (26 contro 46 HCC). Inoltre, non possiamo dimostrare se il diverso comportamento di pazienti con differenti livelli di miR-221 sia da imputare alla sola regolazione di Bmf o ad altri bersagli molecolari non ancora individuati o, ancora più probabilmente, all'intero set di geni regolati dal miR-221.

Nessuna associazione significativa è stata invece trovata tra i livelli di miR-221 o Bmf e la mortalità dopo intervento chirurgico associata al tumore. Questo potrebbe essere spiegato dal fatto che una percentuale di pazienti curativamente trattati per HCC muoiono per complicazioni dovute alla cirrosi o per insorgenza di un nuovo epatocarcinoma. Inoltre non è stata trovata alcuna correlazione tra i livelli di miR-221 o del suo gene target con il grado istopatologico, la dimensione del tumore, le infezioni virali ed i livelli di AFP. I pazienti arruolati in questo studio sono descritti in Tabella 21.

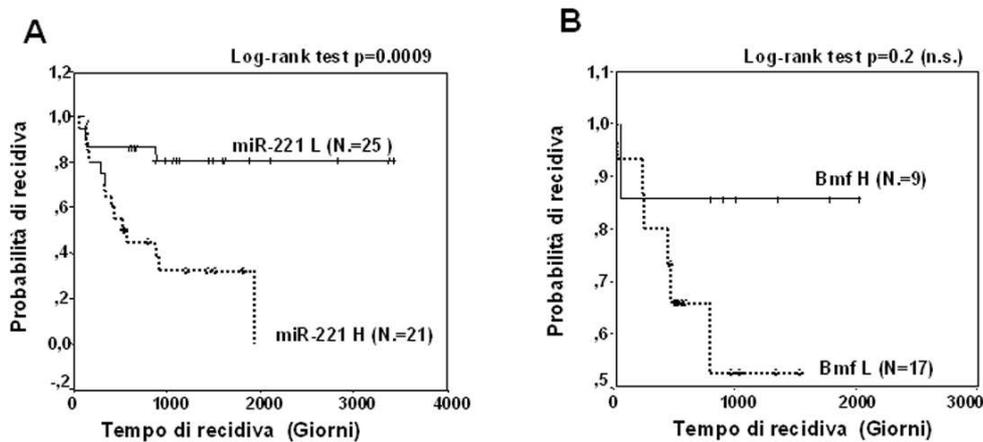


Figura 33. Probabilità di recidiva epatica in pazienti con HCC. (A, B) Associazione tra i livelli di miR-221 o Bmf ed il TTR. Alti e bassi livelli di miR-221 o Bmf sono stati categorizzati in base al valore medio. I log-rank p-value provengono dall'analisi di Kaplan-Meier.

Tabella 21. Caratteristiche dei pazienti con HCC analizzati nello studio del miR-221 e di Bmf.

N.	Genere	Età	Eziologia (1)	Focalità (2)	Dimensioni (3)	AFP (4)	Grado (5)
1	M	65	HBV+Ethanol	uni	3	5	G2
2	M	52	None	uni	5	5	G2
3	M	70	HCV	uni	4	35	G3
4	F	65	HCV	uni	3	3	G3
5	F	62	HCV	uni	3	76	G3
6	M	67	HCV	uni	6	3352	G3
7	M	77	HBV-Ab	uni	5	4	G3
8	M	70	Ethanol	uni	5	537	G3
9	M	65	HCV+Ethanol	uni	3	20	G3
10	F	80	HCV	uni	5	76	G3
11	F	59	HCV	uni	6	7	G4
12	F	66	HCV	uni	8	9572	G3
13	F	68	None	uni	5.5	2	G3
14	M	59	HCV	uni	5	86	G3
15	F	82	HCV	uni	7.5	964	G3
16	M	60	Ethanol	uni	2	156	G2
17	M	78	HCV	uni	3	9	G2
18	M	54	HBV	uni	4	162	G2
19	M	69	HCV	uni	10	390	G3
20	M	74	None	uni	11	78	G3
21	M	73	HCV	uni	4.5	2	G3
22	M	77	HCV	uni	2.2	48	G2
23	F	71	HCV	uni	2	276	G3
24	M	68	HCV	multi	2.5	5	G2
25	M	81	HCV	multi	3	8	G3
26	M	74	HCV	multi	3.5	2198	G3
27	M	74	HCV+HBV	multi	3	75	G4
28	M	82	None	multi	5	4	G3
29	M	51	HBV+HCV	multi	7	1924	G3
30	M	79	HCV	multi	10	7	G3
31	M	70	HCV	multi	2.3	46	G3
32	M	72	HCV	multi	3.4	18	G3
33	M	70	None	multi	10	11	G2
34	M	75	HCV	multi	7	9	G3
35	M	59	HCV	multi	3	76	G3
36	M	67	None	multi	6	18766	G3
37	M	65	HCV	multi	6.5	167	G3
38	M	76	HBV-Ab	multi	5	10.000	G4
39	M	49	HBV	multi	4	2708	G4
40	F	53	HCV	multi	4	60	G3
41	F	62	HCV	multi	3	468	G2
42	M	79	HBV	multi	7	540	G4
43	M	68	HCV	multi	8	86	G3
44	M	65	HCV	multi	7	139.313	G4
45	M	64	HCV+Ethanol	multi	6.5	8	G3
46	M	60	HCV	multi	3.2	15	G2
47	M	60	HCV	multi	1.3	257	G4
48	M	58	HCV	multi	3	132	G3
49	M	66	HCV	multi	3	58	G2

50	M	75	HCV	multi	3	63	G3
51	M	68	HCV	multi	6.5	131	G3

1) Cause della sottostante patologia epatica: HBV: Virus Epatite B; HCV: Virus Epatite B; BAb: anticorpi contro HBV; Etanolo: storia di abuso di alcol; Criptogenici sono quei casi in cui sono stati esclusi: infezioni virali, abuso di alcol, emocromatosi, patologia di Wilson, deficienza di α 1-anti-tripsina, cirrosi biliare primaria, epatite autoimmune e colangite sclerosante primaria.

2) Uni-o multifocalità è stata assegnata sulla base di tecniche di imaging precedenti l'intervento chirurgico.

3) Dimensioni del nodulo di HCC (cm)

4) Livelli di alfa-feto-proteina sono stati misurati prima dell'intervento.

5) Grado di HCC è stato assegnato attraverso i criteri di Edmonson e Steiner's (74).

3.4 Studio del ruolo biologico del microRNA-199a-3p: regolazione dei pathway molecolari di mTOR e c-Met in linee cellulari di epatocarcinoma

Tra i 35 microRNA deregolati nei campioni di HCC, individuati tramite analisi di microarray, abbiamo investigato il ruolo del miR-199a-3p poiché tale miRNA risultava sotto-espresso nella maggior parte degli epatocarcinomi (70%), così come in altri tumori umani (116, 117), in linee cellulari derivate da neoplasia (118, 119) ed in modelli animali di steatoepatite (120). Inoltre, dati di letteratura riportano la regolazione di differenti geni target da parte del miR-199a-3p quali c-Met (56), Smad1 (121), LIF (122) e dimostrano che l'espressione esogena di tale miR riduce la motilità e la sopravvivenza di linee cellulari derivate da melanoma, cancro gastrico e cancro del polmone (119).

Allo scopo di caratterizzare il ruolo del miR-199a-3p nel processo di epatocarcinogenesi, abbiamo eseguito un'analisi bioinformatica al fine di individuare ipotetici geni bersaglio di questo miR. Tale analisi ha consentito di individuare l'oncogene mTOR (Mammalian Target Of Rapamycin) come possibile bersaglio molecolare del miR-199a-3p. Tutti gli algoritmi utilizzati, MiRanda, Pictar and TargetScan (**Figura 34A**) hanno infatti individuato un sito bersaglio del miR-199a-3p nella regione 3'UTR dell'RNA messaggero di mTOR.

L'oncogene mTOR è una serina/treonina cinasi che gioca un ruolo chiave nella crescita cellulare, nella traduzione proteica, nell'invasione e nell'apoptosi (123). Il pathway di mTOR viene attivato da multipli segnali extra-cellulari come fattori di crescita, aminoacidi, ormoni e fitogeni, portando alla fosforilazione del regolatore della traduzione, la cinasi RPS6-p-70, la quale a sua volta regola la proliferazione cellulare, la sintesi proteica e consente la progressione dalla fase

G1 alla fase S del ciclo cellulare. Inoltre, il pathway di mTOR risulta implicato nell'iniziazione e nella progressione di numerosi tipi di tumore, incluso l'epatocarcinoma, risultando perciò un promettente bersaglio terapeutico per il trattamento dell'HCC (124, 125). In particolare, nell'epatocarcinoma l'attivazione del pathway di mTOR è associata ad una prognosi peggiore e all'aumentato rischio di metastatizzazione (126).

Allo scopo di studiare la regolazione di mTOR da parte del miR-199a-3p, abbiamo analizzato tre linee cellulari derivate da HCC (Huh-7, HepG2 e SNU475) per i livelli di espressione del miR-199a-3p e di mTOR tramite analisi di Real time PCR, di Western blot e di RT-PCR (**Figura 34B, C**). Da tale analisi si può osservare la presenza di una correlazione inversa tra i livelli di miR-199a-3p ed i livelli proteici di mTOR, mentre non vi è alcuna correlazione tra l'espressione del miR ed il livelli di mRNA di mTOR (**Figura 34D**).

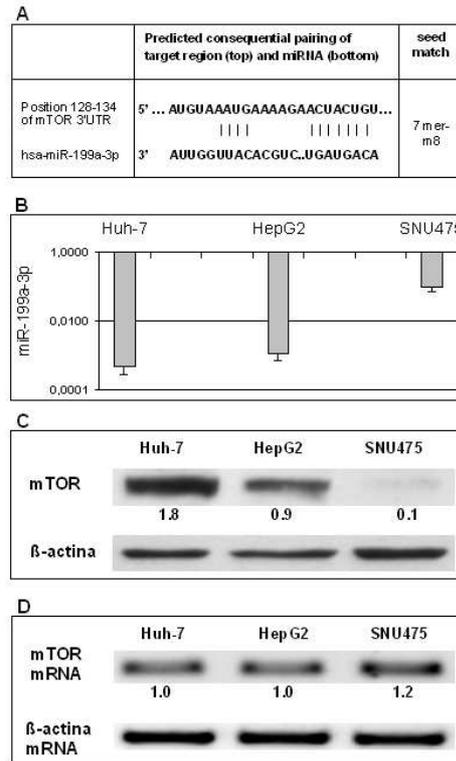


Figura 34. Sito di appaiamento tra il miR-199a-3p ed il 3'UTR di mTOR. Analisi di linee di HCC. (A) Sito di legame del miR-199a-3p nel 3'UTR di mTOR, come predetto dall'algoritmo TargetScan. **(B)** Analisi di Real time PCR del miR-199a-3p in linee cellulari di HCC. Il gene U6RNA è stato utilizzato come gene housekeeping. Nell'asse delle ordinate è riportato il valore di $2^{(-\delta\delta Ct)}$ in scala logaritmica. Ogni campione è stato analizzato in triplicato. Colonne: valore medio; Barre: deviazione standard. **(C,D)** Analisi di Western blot e di RT-PCR di mTOR in linee di HCC. La β -actina è stata utilizzata come gene housekeeping per la normalizzazione sia dei livelli di mRNA che di proteina. I valori rappresentano il rapporto tra mTOR e la β -actina.

Allo scopo di dimostrare che il miR-199a-3p partecipa alla regolazione dell'espressione di mTOR, abbiamo eseguito un'analisi funzionale *in vitro* sovra-esprimendo o silenziando il miR-199a-3p in linee cellulari derivate da HCC. Le linee HepG2 e Huh-7 sono state selezionate per la sovra-espressione del miR-199a-3p, in quanto esprimono livelli costitutivi molto bassi di tale miR in presenza di alti livelli della proteina mTOR. In seguito alla trasfezione, l'espressione del miR-199a-3p nelle due linee di HCC è risultata simile a quella

osservata nei campioni provenienti da fegato sano (**Figura 35**); tale dato mostra quindi che nei nostri saggi in vitro abbiamo quindi ripristinato il miR-199a-3p a livelli simili a quelli fisiologici.

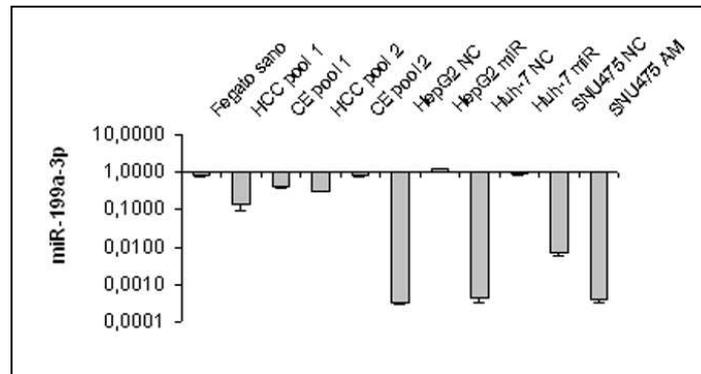


Figura 35. Espressione del miR-199a-3p in linee cellulari e campioni biologici. (A) Analisi di Real-time PCR del miR-199a-3p nel fegato sano (pool di 6 casi), in campioni di HCC (pool di 5 casi), campioni di CE (pool di 5 CE circostanti i noduli di HCC) e linee cellulari trasfettate con miR-199a-3p (miR), anti-miR-199a-3p (AM) e controlli negativi (NC). Il gene U6RNA è stato utilizzato come gene housekeeping. Il valore di $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ è stato riportato nell'asse delle ordinate in scala logaritmica. Ogni campione è stato corso in triplicato. Colonne: valore medio; Barre: deviazione standard.

L'analisi di Western blot ha rivelato una diminuzione di 1.9 e 1.4 volte nei livelli di espressione di mTOR nelle linee HepG2 e Huh-7, rispettivamente. Al fine di dimostrare che anche il pathway a valle di mTOR era modulato dal miR-199a-3p, abbiamo analizzato il grado di fosforilazione della proteina ribosomale S6, un bersaglio della cinasi RPS6-p70. La trasfezione del miR-199a-3p ha determinato una sotto-espressione della isoforma fosforilata della proteina S6 (P-S6) sia nelle cellule HepG2 che Huh-7 (9.1 e 1.3 volte, rispettivamente) Non è stata invece individuata alcuna diminuzione dei livelli di mRNA di mTOR (**Figura 36A, B**). Al contrario, la linea SNU475 è stata scelta per il silenziamento del miR-199a-3p poiché essa esprime alti livelli basali di miR-199a-3p associati a

bassi livelli proteici di mTOR. L'inibizione del miR-199a-3p nelle cellule SNU475 ha determinato un aumento sia di mTOR che di P-S6, ma nessuna variazione a livello di mTOR mRNA (**Figura 36C**). Questi dati suggeriscono una regolazione post-trascrizionale, blocco della traduzione, di mTOR da parte del miR-199a-3p in linee di HCC.

Successivamente, per dimostrare l'interazione diretta tra miR-199a-3p ed il sito complementare presente nella regione 3'UTR di mTOR, un'ampia regione del 3'UTR è stata clonata a valle del gene reporter nel vettore pGL3. Il vettore così ottenuto, chiamato pGL3-mTOR è stato co-trasfettato nelle linee Huh-7 e SNU475 insieme a miR-199a-3p, anti-miR-199a-3p o controlli negativi e la variazione di attività luciferasica è stata saggiata tramite il Dual Luciferase Assay. Le cellule Huh-7 trasfettate con il vettore pGL3-mTOR hanno mostrato una diminuzione di 1.3 volte dell'attività luciferasica quando co-trasfettate con il miR-199a-3p (t-test, $p=0.03$). Al contrario, le cellule SNU475 trasfettate con il vettore pGL3-mTOR hanno mostrato una diminuzione di 3.0 volte dell'attività luciferasica quando co-trasfettate con l'anti-miR-miR-199a-3p (t-test, $p=0.006$) (**Figura 36D**). Inoltre la sequenza complementare al miR-199a-3p è stata mutagenizzata nella regione 3'UTR di mTOR, per generare il vettore mutato pGL3-mTOR-m1. Nessuna variazione significativa dell'attività luciferasica è stata osservata in seguito a co-trasfezione del vettore mutagenizzato con il miR-199a-3p o l'anti-miR-199a-3p (**Figura 36D**). Presi insieme, questi dati dimostrano la presenza di interazione diretta tra miR-199a-3p ed mTOR mRNA in linee cellulari derivate da HCC.

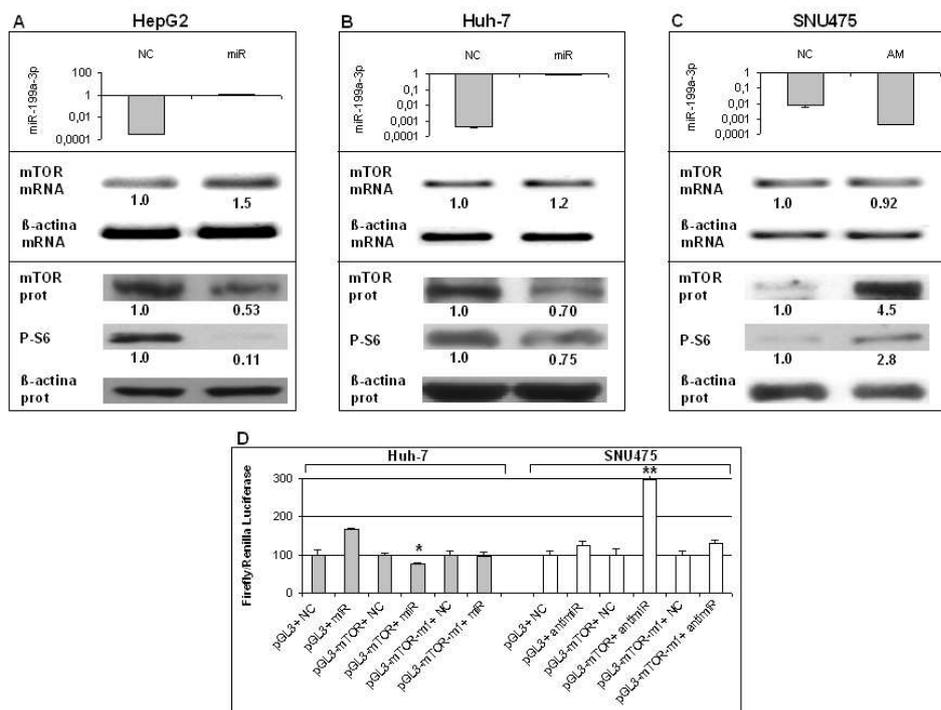


Figura 36. mTOR è un bersaglio del miR-199a-3p. (A-C) Trasfezione di miR-199a-3p (miR), anti-miR-199a-3p (AM) e controlli negativi (NC) nelle linee cellulari HepG2, Huh-7 e SNU475. Analisi di Real time PCR del miR-199a-3p. Il gene U6RNA è stato utilizzato come gene housekeeping. Il valore di $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ è stato riportato nell'asse delle ordinate in scala logaritmica. Ogni campione è stato corso in triplicato. Colonne: valore medio; Barre: deviazione standard. Analisi di RT-PCR e Western blot per determinare l'espressione di mTOR e P-S6. La β-actina è stata utilizzata come gene housekeeping per la normalizzazione sia dei livelli di mRNA che di proteina. I valori rappresentano il rapporto tra mTOR o P-S6 e la β-actina. (D) Saggio di luciferasi nelle cellule Huh-7 e SNU475. Il vettore pGL3-mTOR ed il vettore mutagenizzato pGL3-mTOR-m1 sono stati co-trasfettati con miR-199a-3p, anti-miR-199a-3p o controlli negativi. Ogni campione è stato corso in triplicato. Colonne: valore medio; Barre: deviazione standard.

3.4.1 Il microRNA-199a-3p ed i suoi bersagli molecolari regolano il ciclo cellulare in linee cellulari di epatocarcinoma

Al fine di analizzare il ruolo biologico del miR-199a-3p nella regolazione del ciclo cellulare, abbiamo trasfettato il miR-199a-3p nelle cellule HepG2 e saggiato la distribuzione attraverso le diverse fasi del ciclo cellulare. Inoltre, per valutare

l'inibizione dell'espressione dei due geni target, mTOR e c-Met, abbiamo eseguito un'analisi di Western blot sulle cellule HepG2 trasfettate con il miR-199a-3p, la quale ha mostrato una diminuzione dell'espressione (1.8 volte) sia di mTOR che di c-Met. Un aumento della popolazione cellulare nella fase G1 (11%) ed una diminuzione del numero di cellule nella fase S (22%) è stata osservata in seguito a sovra-espressione del miR-199a-3p, rispetto alle cellule trasfettate con il controllo negativo (t-test, $p < 0.01$). In accordo con l'analisi citofluorimetrica (FACS), abbiamo osservato tramite Western blot ed RT-PCR un aumento di espressione di due importanti inibitori del ciclo cellulare, CDKN1A/p21 e CDKN1B/p27, in seguito al ripristino dei livelli fisiologici di miR-199a-3p nelle cellule HepG2 (**Figura 37A**).

Inoltre, essendo noto il ruolo del miR-199a-3p nella regolazione del proto-oncogene c-Met in diverse linee cellulari (56) ed il suo coinvolgimento nella modulazione della proliferazione cellulare, per discriminare quale bersaglio del miR-199a-3p, mTOR o c-Met, contribuisse maggiormente alla regolazione del ciclo cellulare, abbiamo silenziato entrambi i geni target tramite specifici siRNA (**Figura 37B, C**). La trasfezione delle cellule HepG2 con entrambi i siRNA contro mTOR o c-Met ha determinato un arresto nella fase G1 (25%) del ciclo cellulare (t-test, $p < 0.01$). In aggiunta, in maniera simile a quanto osservato con il miR-199a-3p, il silenziamento di mTOR e c-Met (diminuzione di 2.9 volte) ha causato un aumento dell'espressione di CDKN1B/p27 sia a livello di mRNA che di proteina. Per quel che riguarda la regolazione di CDKN1A/p21, il silenziamento di c-Met ha portato ad un aumento della sua espressione, mentre il silenziamento di mTOR ha determinato una diminuzione dei livelli proteici di CDKN1A/p21 (**Figura 37B, C**).

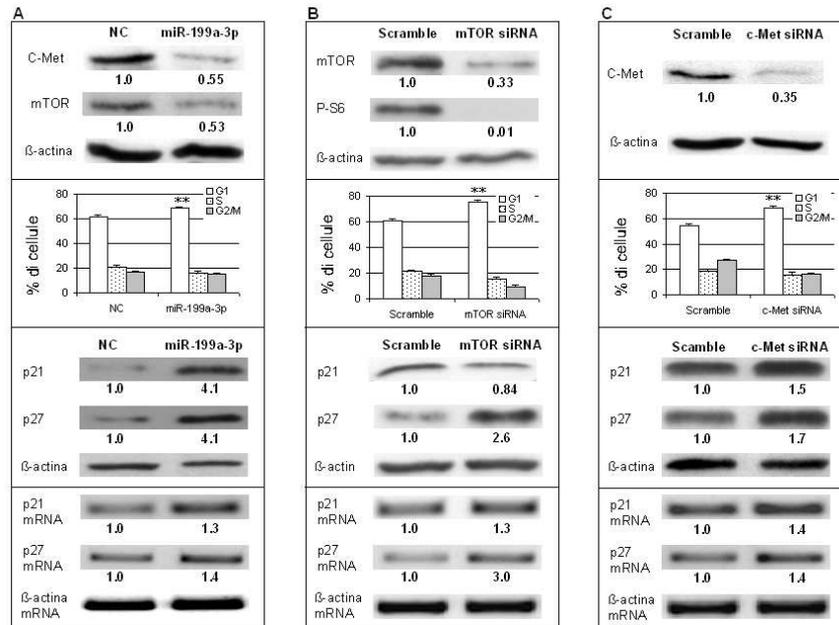


Figura 37. Il miR-199a-3p regola il ciclo cellulare della linea HepG2. (A) Analisi di Western blot di mTOR e c-Met nelle cellule HepG2 trasfettate con il miR-199a-3p o con un controllo negativo (NC). Analisi FACS di cellule HepG2 trasfettate con il miR-199a-3p. Analisi di WB ed RT-PCR per i due inibitori CDKN1A/p21 e CDKN1B/p27. **(B, C)** Analisi di Western blot di mTOR e c-Met nelle cellule HepG2 trasfettate con siRNA contro mTOR o c-Met o con un controllo negativo (Scramble). Analisi FACS di cellule HepG2 silenziate per mTOR o c-Met. Analisi di Western blot ed RT-PCR per i due inibitori CDKN1A/p21 e CDKN1B/p27. La β -actina è stata utilizzata come gene housekeeping per la normalizzazione sia dei livelli di mRNA che di proteina. I valori rappresentano il rapporto tra l'espressione genica e la β -actina. Analisi FACS: ogni campione è stato analizzato in duplicato. Colonne: valore medio; Barre: deviazione standard.

In aggiunta, per confrontare i nostri dati con quelli riportati dalla letteratura (127), abbiamo bloccato il pathway di mTOR trattando la linea HepG2 con la Rapamicina, un noto inibitore del pathway di mTOR. Questo trattamento ha provocato un arresto del ciclo cellulare in fase G1 (11%) ($p=0.04$, t-test) ed un blocco della fosforilazione della proteina S6, simili a quelli osservati in seguito alla trasfezione del miR-199a-3p (**Figura 38**). Inoltre, in seguito al trattamento con Rapamicina, è stata osservata una diminuzione dell'espressione di CDKN1A/p21.

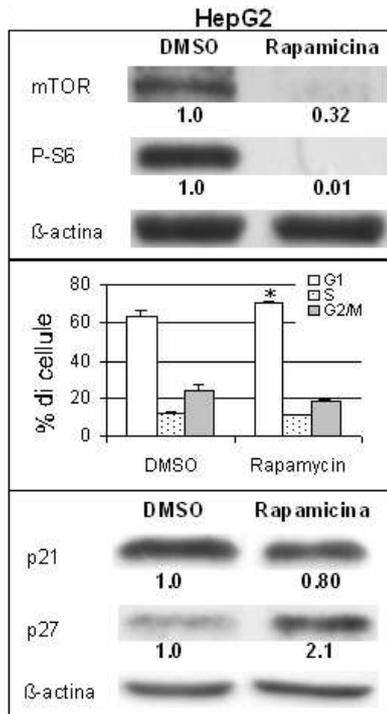


Figura 38. Il trattamento con Rapamicina regola il ciclo cellulare della linea HepG2. Analisi di Western blot di mTOR e P-S6 nelle cellule HepG2 trattate con la Rapamicina o con il veicolo (DMSO). Analisi FACS di cellule HepG2 trattate con Rapamicina. Analisi di WB per i due inibitori CDKN1A/p21 e CDKN1B/p27. La β-actina è stata utilizzata come gene housekeeping. I valori rappresentano il rapporto tra p21 e p27 e la β-actina.

Per caratterizzare ulteriormente il contributo del miR-199a-3p nella regolazione del ciclo cellulare, abbiamo silenziato il miR-199a-3p nelle cellule SNU475 e trasfettato le stesse con i siRNA contro mTOR o c-Met. In linea con i dati precedenti, il trattamento con l'anti-miR-199a-3p ha rivelato una riduzione (20%) ($p < 0.01$, t-test) del numero di cellule in fase G1, rispetto alle cellule trasfettate con il controllo negativo (**Figura 39A**). In particolare, il silenziamento di mTOR o c-Met successivo alla trasfezione con l'anti-miR-199a-3p ha portato ad un parziale ripristino del fenotipo indotto dall'anti-miR-199a-3p, con un aumento della fase G1 (8% con mTOR siRNA e 12% con c-Met siRNA; t-test, $p = 0.028$ e $p = 0.014$, rispettivamente) (**Figura 39B**). Presi insieme, questi dati

dimostrano che il miR-199a-3p contribuisce alla modulazione del ciclo cellulare di cellule derivate da HCC, almeno in parte, attraverso il silenziamento di mTOR e di c-Met.

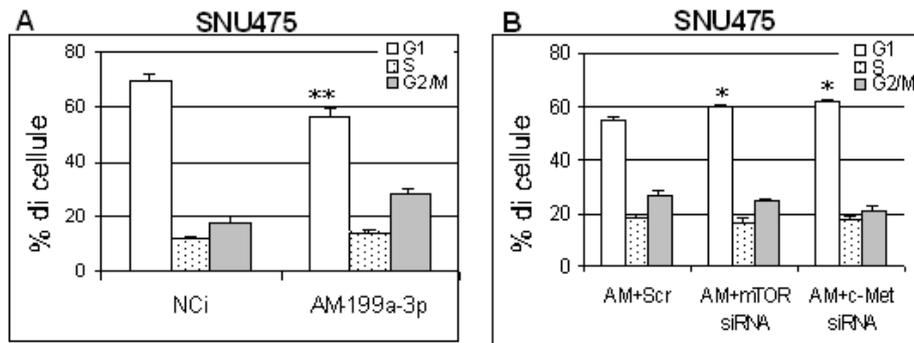


Figura 39. Il miR-199a-3p regola il ciclo cellulare attraverso l'inibizione di mTOR e c-Met. (A) Analisi FACS di cellule SNU475 trasfettate con l'anti-miR-199a-3p (AM-199a-3p) o con il controllo negativo (NCi). (B) Analisi FACS di cellule SNU475 trasfettate con l'anti-miR-199a-3p (AM-199a-3p) e successivamente silenziate con siRNA contro mTOR o c-Met. Analisi FACS: ogni campione è stato analizzato in duplicato. Colonne: valore medio; Barre: deviazione standard.

3.4.2 Il microRNA-199a-3p regola la sensibilità alla Doxorubicina, l'apoptosi in condizioni ipossiche e le capacità invasive in linee cellulari di epatocarcinoma

Dati di letteratura riportano che l'inibizione del pathway di mTOR da parte della Rapamicina, o di farmaci analoghi, ha un effetto anti-tumorale sinergico quando co-somministrata con il chemioterapico Doxorubicina in modelli animali di HCC (128). Per tale motivo, in questo lavoro di tesi abbiamo investigato se, oltre al trattamento con analoghi della Rapamicina, anche il ripristino del miR-199a-3p od il silenziamento dei suoi geni target potesse modulare il processo di

apoptosi indotto dalla Doxorubicina. Poiché la Rapamicina induce apoptosi in maniera p53-dipendente (129), abbiamo utilizzato la linea cellulare HepG2, la quale esprime un'isoforma wild-type della proteina p53. In seguito al trattamento con Doxorubicina, l'analisi FACS con l'anticorpo anti-Annexina V ha rivelato un aumento dell'apoptosi di 2.5 volte ($p=0.005$, t-test) in seguito al ripristino dei livelli fisiologici di miR-199a-3p. In maniera del tutto simile, un aumento del numero di cellule apoptotiche è stato osservato in seguito al silenziamento sia di mTOR che di c-Met (3.0 e 1.6 volte) ($p=0.005$ e $p=0.03$, t-test), con il più alto incremento nelle cellule trattate con i siRNA anti-mTOR (**Figura 40A**). Come ulteriore prova a favore dell'incrementata apoptosi cellulare, un aumento dei livelli di Caspasi-3 attivata è stato osservato sia nelle cellule trasfettate con il miR-199a-3p che nelle cellule silenziate per mTOR. Inoltre, una sovra-espressione dell'mRNA di Puma, un target trascrizionale di p53, è stata osservata in seguito al ripristino dei livelli di miR-199a-3p come pure in seguito al silenziamento sia di mTOR che c-Met (**Figura 40B**). Questi dati dimostrano che il miR-199a-3p incrementa la sensibilità delle cellule HepG2 alla Doxorubicina a livelli simili a quelli del silenziamento di mTOR e che il processo apoptotico è scatenato, almeno in parte, dall'attivazione della cascata delle caspasi.

Poiché è noto che il pathway di mTOR incrementa la stabilità della proteina HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor 1A) in condizioni di ipossia (130) e che il miR-199a-5p regola direttamente l'espressione del gene HIF-1 α (131), abbiamo analizzato il ruolo dei miR-199a-3p e miR-199a-5p nella suscettibilità all'apoptosi in condizioni ipossiche nelle cellule HepG2. L'analisi FACS-Annexin V ha mostrato un aumento del numero di cellule apoptotiche nella linea

HepG2 trattata sia con il miR-199a-3p che con il miR-199a-5p e coltivata in condizioni ipossiche (**Figura 40C**).

Successivamente abbiamo investigato tramite Matrigel assay il ruolo del miR-199a-3p e dei suoi geni target nella modulazione della capacità invasiva di linee cellulari di epatocarcinoma. Dati di letteratura dimostrano che il proto-oncogene c-Met è coinvolto in un complesso programma biologico note come ‘crescita invasiva’ il quale consiste nella stimolazione della motilità ed invasione cellulare e nella protezione dall’apoptosi (132). Il saggio di invasione ha evidenziato una ridotta capacità invasiva sia delle cellule HepG2 trasfettate con il miR-199a-3p (2.5 volte; t-test, $p=0.009$), che delle cellule trasfettate con i siRNA contro c-Met (1.7 volte; t-test, $p=0.017$), rispetto alle cellule trasfettate con i controlli negativi. Al contrario, le cellule silenziate per mTOR non hanno mostrato una riduzione significativa nel numero di cellule capaci di attraversare lo strato di Matrigel (t-test, $p=0.15$). In accordo con questi dati, le cellule SNU475 trasfettate con l’anti-miR-199a-3p hanno mostrato un’aumentata capacità invasiva (2.2 volte; t-test, $p=0.0005$), rispetto alle cellule trasfettate con un oligonucleotide di controllo (**Figura 40D**). Questi dati dimostrano che il miR-199a-3p è in grado di diminuire il potenziale invasivo delle cellule di HCC attraverso l’inibizione di c-Met. Inoltre, la maggiore diminuzione della capacità invasiva da parte del miR-199a-3p rispetto al silenziamento di c-Met lascia ipotizzare che il miR possa agire sul potenziale invasivo delle cellule di HCC attraverso la regolazione di multipli geni bersaglio.

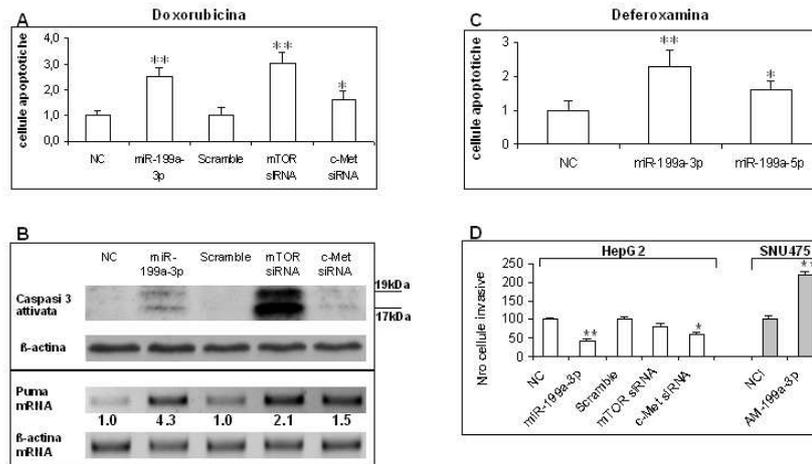


Figura 40. Il miR-199a-3p regola la sensibilità alla Doxorubicina, la crescita in condizioni ipossiche e l'invasione cellulare. (A) Analisi FACS-Annexina V in cellule HepG2 trasfettate e sottoposte a trattamento con Doxorubicina. (B) Analisi di Western blot della Caspasi 3 attivata e di RT-PCR di Puma mRNA in cellule HepG2 trasfettate e sottoposte a trattamento con Doxorubicina. La β -actina è stata utilizzata come gene housekeeping. I valori rappresentano il rapporto tra Puma e la β -actina. (C) Analisi FACS-Annexina V in cellule HepG2 trasfettate e sottoposte a trattamento con Deferoxamina. (D) Matrigel assay in cellule HepG2 e SNU475 trasfettate. Sono stati contati 20 campi indipendenti ad un ingrandimento di 25X. Analisi FACS e il saggio di invasione: ogni campione è stato analizzato in duplicato. Colonne: valore medio; Barre: deviazione standard.

3.4.3 Ruolo prognostico del microRNA-199a-3p: correlazione con il tempo di insorgenza di recidiva epatica in pazienti chirurgicamente trattati per epatocarcinoma

Al fine di confermare i dati di microarray, per saggiare l'espressione del miR-199a abbiamo eseguito un'analisi di Real time PCR su 39 tessuti di HCC e circostante fegato cirrotico. Una significativa diminuzione dell'espressione sia del miR-199a-3p che del miR-199a-5p è stata osservata in campioni di HCC quando paragonati ai campioni provenienti dal tessuto cirrotico circostante (**Figura 41A, B**) (ANOVA: $p=0.0009$). L'espressione proteica di mTOR è stata determinata tramite analisi di Western blot ed è risultata aumentata in 23 dei 39 pazienti con

HCC inclusi in questo studio (**Tabella 22**). Una correlazione inversa tra l'espressione del miR-199a-3p e quella di mTOR è stata individuata nei campioni di HCC (Pearson's correlation: $p < 0.0001$) (**Figura 41C**). Inoltre, bassi livelli di miR-199a-3p sono risultati associati ad un diminuito tempo di ricorrenza della recidiva epatica (TTR) nei pazienti trattati chirurgicamente per epatocarcinoma (log-rank test, $p = 0.04$, **Figura 41D**). Al contrario, nessuna associazione è stata identificata con la sopravvivenza dei pazienti analizzati. In aggiunta, nessuna correlazione è stata individuata tra il miR-199a-3p ed i livelli di AFP, dimensioni del tumore, focalità, grado istologico ed eziologia della sottostante cirrosi.

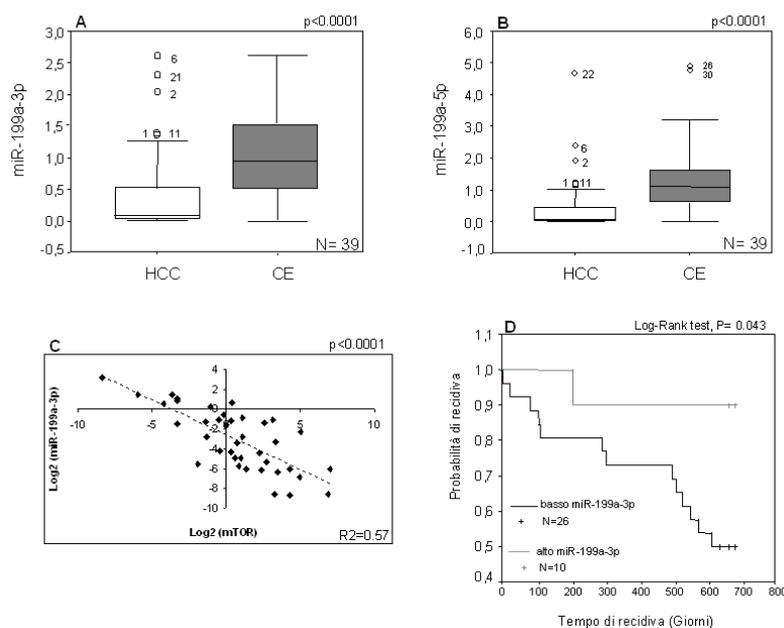


Figura 41. Espressione di miR-199a-3p e miR-199a-5p in campioni di HCC e correlazione con mTOR e TTR. (A, B) Grafici box-plot di 39 campioni di HCC e circostrante fegato cirrotico (CE) raggruppati sulla base dei livelli di espressione dei miR-199a-3p e miR-199a-5p. Le tre barre orizzontali dall'alto al basso rappresentano il 75esimo, il 50esimo (mediana) ed il 25esimo percentile, rispettivamente. I valori esterni sono rappresentati dai cerchi. **(C)** Correlazione inversa tra il miR-199a-3p ed mTOR nei tessuti di HCC (two-tailed Pearson's test, $p < 0.0001$). Ogni dato derivante da campioni di HCC è stato normalizzato con il valore della rispettiva cirrosi ed espresso in forma logaritmica (log_2). **(D)** Analisi di Kaplan-Meier della probabilità di recidiva epatica di pazienti con HCC.

I pazienti sono stati categorizzati sulla base del valore medio di espressione del miR-199a-3p.

Tabella 22. Caratteristiche dei pazienti con HCC analizzati nello studio del miR-199a.

N.	Genere	Età	Eziologia (1)	Focalità (2)	Dimensioni (3)	AFP (4)	Grado (5)
1	M	60	Ethanol	uni	1.8	156	G4
2	M	82	None	multi	5.2	4	G3
3	M	70	HCV	uni	4.0	35	G3
4	M	65	HCV+Ethanol	uni	3.0	20	G3
5	M	65	HBV+Ethanol	uni	3.0	5	G2
6	M	77	HBV-Ab	uni	5.0	4	G3
7	M	59	HCV	uni	5	86	G3
8	M	74	HCV	multi	3.5	2198	G3
9	M	65	HCV	multi	6.5	167	G3
10	M	60	HCV	multi	1.3	252577	G4
11	F	71	HCV	uni	2.0	276	G3
12	M	74	None	uni	11	78	G3
13	F	80	HCV	uni	5.0	76	G3
14	M	59	HCV	multi	3.0	76	G2
15	M	75	HCV	multi	3	63	G3
16	F	73	None	uni	5.5	2	G3
17	M	76	HBV-Ab	multi	5	10000	G4
18	M	75	HCV	multi	7.0	9	G3
19	F	78	HCV	uni	8.0	9572	G3
20	M	51	HBV+HCV	multi	7.0	1924	G3
21	M	52	None	uni	5.0	5	G2
22	M	70	HCV	multi	2.3	46	G3
23	F	82	HCV	uni	7.5	67	G3
24	M	54	HBV	uni	4	162	G2
25	M	69	HCV	uni	10	390	G3
26	M	81	HCV	multi	3	210	G3
27	M	66	HCV	multi	3.0	58	G2
28	M	65	HCV	multi	7.0	139313	G4
29	M	78	HCV	uni	3	9	G2
30	M	67	None	multi	6.0	18766	G3
31	M	68	HCV	multi	8.0	86	G3
32	M	72	HCV	multi	3.4	18	G3
33	M	70	Ethanol	uni	5.0	537	G3
34	F	65	HCV	uni	3.0	3	G3
35	M	73	HCV	uni	4.5	2	G3
36	M	79	HBV	multi	7.0	540	G4
37	M	77	HCV	uni	2.2	48	G2
38	M	74	HCV+HBV	multi	5.0	75	G4
39	M	79	HCV	multi	10	7	G3

1) Cause della sottostante patologia epatica: HBV: Virus Epatite B; HCV: Virus Epatite B; AB: anticorpi contro HBV; Etanolo: storia di abuso di alcol; Criptogenici sono quei casi in cui sono stati esclusi: infezioni virali, abuso di alcol, emocromatosi, patologia di Wilson, deficienza di α 1-anti-tripsina, cirrosi biliare primaria, epatite autoimmune e colangite sclerosante primaria.

2) Uni-o multifocalità è stata assegnata sulla base di tecniche di imaging precedenti l'intervento chirurgico.

- 3) Dimensioni del nodulo di HCC (cm)
- 4) Livelli di alfa-feto-proteina sono stati misurati prima dell'intervento.
- 5) Grado di HCC è stato assegnato attraverso i criteri di Edmonson e Steiner's (74).

CAPITOLO 4

DISCUSSIONE

4.1 L'identificazione di un pannello di microRNA rappresenta un passaggio fondamentale per l'individuazione di nuovi bersagli terapeutici per il trattamento non-convenzionale di pazienti con epatocarcinoma in stadio intermedio-avanzato

Negli ultimi anni, lo sviluppo di piattaforme di microarray per l'analisi dell'espressione dei microRNA ha rivelato che molti miRNA sono aberrantemente espressi nei tumori umani, suggerendo che essi potrebbero rappresentare una nuova classe di oncogeni o geni oncosoppressori (36, 57, 60, 75, 133, 134). Numerosi studi riportano la deregolazione dell'espressione dei microRNA nelle neoplasie umane (95, 97, 135), sottolineando il loro contributo fondamentale nei processi di iniziazione e progressione tumorale. A tale riguardo, l'identificazione di miRNA cancro-specifici e dei loro bersagli molecolari rappresenta un passaggio chiave per caratterizzare il ruolo dei miRNA nella tumorigenesi umana e potrebbe essere importante per l'identificazione di nuovi bersagli terapeutici.

In questo lavoro di tesi, abbiamo eseguito un'analisi dei profili di espressione dei microRNA in campioni di epatocarcinoma insorto su di un fegato con pregressa cirrosi epatica. L'indagine dell'espressione dei miRNA nell'HCC, ha consentito di individuare una *signature* di 35 miRNA differenzialmente regolati nel tessuto tumorale rispetto al circostante tessuto cirrotico. I nostri dati suggeriscono che l'espressione aberrante di un ristretto pannello di miRNA è in grado di predire con una buona accuratezza la natura del campione analizzato e che tali miRNA potrebbero partecipare agli eventi molecolari che portano allo sviluppo di epatocarcinoma (136). A conferma della validità scientifica della

nostra analisi, alcuni dei miRNA differenzialmente espressi nell'HCC erano stati precedentemente individuati in altri tumori umani, suggerendo il loro coinvolgimento in comuni processi di cancerogenesi. Tra questi la famiglia di let-7 risultava deregolata in numerose neoplasie umane (61, 62), il miR-221 era sovra-espresso nel carcinoma della tiroide e nel glioblastoma (97, 135), mentre il miR-145 risultava sotto-espresso nel cancro del colon e della mammella (133, 137). Di notevole interesse il miR-122, un microRNA epato-specifico, è risultato sotto-espresso nella maggior parte degli HCC ed in tutte le linee esaminate.

Altri studi hanno riportato il ruolo dei miRNA nell'epatocarcinogenesi umana, ed abbiamo individuato sia differenze che buone sovrapposizioni con i dati del nostro gruppo di ricerca. Ad esempio, nello studio di Murakami *et al* (43), probabilmente a causa del differente approccio analitico utilizzato, nessuno degli appena menzionati miRNA cancro-specifici è emerso ed inoltre vi era una scarsa sovrapposizione tra i 35 miRNA individuati dal nostro gruppo e quelli presenti nella loro lista, tra cui risultavano comuni solo il miR-195 ed il miR-199a. Al contrario, l'articolo di Kutay *et al* (45), nonostante fosse basato su di un esiguo numero di casi, ha mostrato che il miR-122 era significativamente sotto-espresso nell'epatocarcinoma umano e di topo, confermando che down-regolazione di questo miRNA potesse avere un ruolo importante nel processo di epatocarcinogenesi.

Il nostro studio è perciò utile nel definire una *signature* di miRNA cancro-associati coinvolti nella tumorigenesi epatica e che potrebbe risultare utile nell'identificazione di potenziali bersagli terapeutici. L'individuazione di miRNA deregolati nell'epatocarcinoma umano rappresenta quindi il primo step per lo

sviluppo di terapie sperimentali per il trattamento non-convenzionale di HCC in stadio intermedio-avanzato.

4.2 La regolazione del pathway ciclina G1/p53 da parte del microRNA-122 rappresenta un possibile meccanismo molecolare implicato nel processo di epatocarcinogenesi, in grado di sensibilizzare le cellule di epatocarcinoma al trattamento con Doxorubicina

La comprensione dei meccanismi molecolari associati alla deregolazione dei miRNA nei tumori umani rimane a tutt'oggi un compito difficile da investigare. Infatti, sebbene programmi bioinformatici possano aiutare nella predizione di ipotetici geni bersaglio, procedure sperimentali *in vitro* sono necessarie per la validazione dei target molecolari. Attualmente sono stati individuati numerosi geni bersaglio di microRNA deregolati nelle neoplasie umane, ma nonostante le incoraggianti evidenze sperimentali in grado di legare i miRNA alla biologia del cancro, si conosce ancora poco riguardo ai circuiti cellulari e molecolari nei quali sono coinvolti i microRNA. Infatti, lo scenario è enormemente complicato dalla capacità dei miRNA di bersagliare multipli pathway molecolari, a volte correlati tra loro ed a volte con funzioni opposte, ed allo stesso tempo dalla ridondanza dei miRNA stessi. Questo dà origine ad un complesso network di regolazione nel quale gli effetti biologici e le proprietà di un singolo miRNA non consentono sempre una spiegazione lineare.

In questo lavoro di tesi, abbiamo investigato il ruolo biologico del microRNA epato-specifico, miR-122, nel processo di epatocarcinogenesi attraverso l'individuazione di geni bersaglio. L'analisi di microarray riportava infatti una

sotto-espressione del miR-122 nella maggior parte dei campioni di HCC, lasciando ipotizzare un possibile coinvolgimento di questo miRNA nella epato-tumorigenesi. Nel nostro studio abbiamo individuato la ciclina G1 come bersaglio molecolare del miR-122 (136) ed abbiamo dimostrato che, attraverso la modulazione della ciclina G1, il miR-122 regola l'espressione e la stabilità dell'oncosoppressore p53 e sensibilizza le linee cellulari di HCC al trattamento con Doxorubicina. Inoltre, abbiamo dimostrato che il miR-122 ed il suo gene bersaglio modulano la capacità invasiva delle linee cellulari esaminate e che la diminuzione dei livelli di miR-122 è associata ad un ridotto tempo di insorgenza della recidiva epatica in pazienti chirurgicamente trattati per epatocarcinoma (138).

L'importanza del miR-122 nella fisiologia epatica è supportata dal fatto che tale miR è specificamente espresso nel fegato sano, rappresentando il 70% della popolazione di miRNA epatici sia nell'uomo che nel topo. Inoltre, è possibile che la sua deregolazione possa avere un ruolo significativo su numerose funzioni epatiche (53). Per esempio, è stato riportato che alcuni dei bersagli molecolari del miR-122 includono geni coinvolti nel fenotipo epatico e nella biosintesi del colesterolo, suggerendo che una perdita del miR-122 possa essere relazionata alla perdita del differenziamento epatico (54). In aggiunta, il miR-122 possiede un sito di legame nel genoma del virus dell'epatite C (HCV), sottolineando il suo ruolo fondamentale nella regolazione della replicazione/adattamento dell'HCV all'interno degli epatociti (55).

La riduzione dei livelli di espressione del miR-122 rappresenta una caratteristica comune nell'epatocarcinoma di natura umana e murina. A tale riguardo la ricostituzione di livelli fisiologici del miR-122 offre la possibilità

teorica di modulare il fenotipo maligno, attraverso la regolazione di numerosi geni bersaglio (139). Infatti, le multiple funzioni cancro-associate esercitate dal miR-122 in linee cellulari di HCC suggeriscono un potenziale uso di questo miR nella terapia dell'HCC, attraverso l'utilizzo di molecole miRNA-mimetiche. Inoltre, l'aumentata sensibilità alla Doxorubicina osservata in seguito al ripristino di livelli fisiologici di miR-122 in linee cellulari di HCC, fa ipotizzare all'impiego di una terapia combinata con chemioterapici e miRNA-mimetici per il trattamento non-convenzionale dell'epatocarcinoma. Per quel che riguarda l'utilizzo di miR-122-mimetici in pazienti con HCV, deve essere posta particolare attenzione all'effetto di tale miR nella replicazione virale; sebbene un recente articolo riporti la mancanza di correlazione tra livelli di miR-122 e carico virale e l'associazione tra bassi livelli di miR-122 e l'assenza di una risposta virologica in seguito a trattamento con interferone (140). In aggiunta, il fegato rappresenta un organo ideale per la terapia basata su piccoli oligonucleotidi poiché è un organo estremamente ricettivo nell'assorbimento di oligonucleotidi somministrati perifericamente, risultando perciò un buon modello per lo sviluppo di approcci anti-tumorali basati sui microRNA (54), come precedentemente riportato in altri tipi di patologie epatiche (141). Inoltre, l'impiego nella pratica clinica di metodi di somministrazione selettiva di farmaci attraverso l'arteria che alimenta direttamente il nodulo di HCC (TACE) rappresenta un ulteriore approccio terapeutico in grado di diminuire la tossicità sistemica ed incrementare la selettività del trattamento farmacologico.

4.3 La regolazione di importanti processi cellulari da parte del microRNA-221 pone le basi per lo sviluppo di un possibile approccio terapeutico con molecole antagoniste dei microRNA per il trattamento non-convenzionale di pazienti con epatocarcinoma in stadio intermedio-avanzato

Studi di profiling hanno consentito di individuare la sovra-espressione del microRNA-221 in numerosi tipi di tumore umano, compreso l'epatocarcinoma (97, 135, 136). In questo lavoro di tesi, abbiamo inizialmente dimostrato il coinvolgimento del miR-221 nella regolazione del ciclo cellulare attraverso la modulazione di due inibitori delle cinasi-ciclina dipendenti (CDKI), CKN1B/p27 e CDKN1C/p57, implicati nella transizione G1/S del ciclo cellulare. Per valutare la rilevanza di questi studi nella patogenesi dell'epatocarcinoma, abbiamo successivamente eseguito un'analisi *ex vivo*, la quale ha consentito di individuare una correlazione inversa tra i livelli di miR-221 e l'espressione dei due CDKI nei tessuti di HCC. Questi dati suggeriscono un ruolo pro-oncogenico del miR-221 nel processo di epatocarcinogenesi, attraverso la promozione della proliferazione delle cellule tumorali.

Successivamente, per meglio caratterizzare il ruolo bio-patologico del miR-221 nel processo di epatocarcinogenesi, abbiamo focalizzato la nostra attenzione nella regolazione di pathway apoptotici da parte del miR-221. A tale riguardo, abbiamo dimostrato che il miR-221 è in grado di inibire l'espressione della proteina pro-apoptotica Bmf in linee cellulari di HCC, e che tale inibizione determina una ridotta attivazione della cascata delle caspasi sia *in vitro* che *in*

vivo. Inoltre, abbiamo dimostrato che il miR-221 regola l'espressione di Bmf anche in condizioni di non-adesione alla matrice cellulare, impedendo il processo di morte cellulare noto come 'anoikis', suggerendo un ruolo del miR-221 nel processo di metastatizzazione tumorale. Ipotesi confermata dall'associazione di alti livelli di miR-221 con HCC di natura multi-focale e con un ridotto tempo di insorgenza di recidiva epatica in pazienti chirurgicamente trattati per epatocarcinoma.

I recenti avanzamenti nella conoscenza delle potenzialità di microRNA nel trattamento dei tumori umani hanno portato allo sviluppo di oligonucleotidi chimicamente stabilizzati, con elevata specificità e ridotta tossicità, in grado di inibire le funzioni dei miRNA quando somministrati perifericamente in differenti modelli animali (54, 142, 143). La regolazione di numerosi pathway molecolari da parte del miR-221 pone quindi le basi per il trattamento non-convenzionale dell'HCC con molecole antagoniste del miR-221.

4.4 La regolazione dei pathway molecolari di mTOR e c-Met da parte del microRNA-199a-3p rappresenta un possibile meccanismo molecolare implicato nel processo di epatocarcinogenesi, in grado di sensibilizzare le cellule di epatocarcinoma al trattamento con Doxorubicina

Lo sviluppo di piattaforme di microarray di miRNA ha mostrato la sotto-espressione del miR-199a-3p in numerosi tipi di tumore umano, incluso l'HCC (50, 116, 117, 136), suggerendo un coinvolgimento di questo miRNA in comuni processi di cancerogenesi. Inoltre, dati di letteratura riportano la regolazione di importanti geni bersaglio, tra cui c-Met (56), Smad1 (121), LIF (122) da parte del

miR-199a-3p e si è osservato che espressione esogena di questo miRNA era in grado di ridurre la motilità e la vitalità di cellule di melanoma, cancro gastrico e del polmone (119). Di notevole interesse, tramite analisi bioinformatica, abbiamo individuato un fattore chiave nella proliferazione cellulare, mTOR, tra gli ipotetici geni bersaglio del miR-199a-3p. La rilevanza del pathway di mTOR nel processo di iniziazione e progressione tumorale è una caratteristica comune a numerosi tipi di tumore umano, incluso l'HCC (124), dove la sua sovra-espressione è associata ad una prognosi peggiore, invasione e metastasi (126). In questo lavoro di tesi abbiamo focalizzato la nostra attenzione nell'individuazione di nuovi geni bersaglio del miR-199a-3p, al fine di meglio caratterizzare il suo ruolo funzionale nell'iniziazione e nella progressione tumorale. Tra i numerosi geni target del miR-199a-3p abbiamo analizzato la regolazione di due importanti oncogeni spesso deregolati nell'HCC, mTOR e c-Met. Abbiamo quindi caratterizzato il ruolo biologico del miR-199a-3p e dei suoi geni target in importanti processi cellulari ed abbiamo osservato che il ripristino di livelli fisiologici di questo miRNA determinava un arresto del ciclo cellulare nella fase G1, una diminuzione delle capacità invasive, un'aumentata suscettibilità a condizioni ipossiche ed un'aumentata morte cellulare in seguito al trattamento con Doxorubicina. Inoltre, la rilevanza di queste analisi *in vitro* è stata confermata dallo studio di campioni di HCC, nei quali è stata individuata una correlazione inversa tra il miR-199a-3p ed il suo gene target mTOR, così come un'associazione tra bassi livelli di miR-199a-3p con un diminuito tempo di insorgenza della recidiva epatica in seguito a resezione per HCC.

La regolazione di pathway chiave cancro-associati, come quelli di mTOR e c-Met, e la modulazione di fondamentali processi fisiologici spesso deregolati

nell'HCC, sottolineano l'importanza del ripristino di livelli fisiologici di miR-199a-3p come possibile strategia terapeutica, combinata alla tradizionale chemioterapia, per il trattamento di tumori ad elevata mortalità come l'epatocarcinoma. A questo proposito, molecole endogene e non tossiche come i microRNA, possono rappresentare un promettente strumento per terapia genica dei tumori (139), in particolare se associati alla Doxorubicina.

4.5 Prospettive future

In questo lavoro di tesi abbiamo dimostrato il chiaro coinvolgimento dei microRNA in processi cellulari alla base della trasformazione maligna dell'epatocarcinoma umano, ipotizzando l'utilizzo di questa nuova classe di molecole come possibili marcatori diagnostici, prognostici ed, eventualmente, come nuovi bersagli o strumenti per una specifica ed innovativa terapia dell'HCC in stadio intermedio-avanzato.

Le prospettive future del nostro gruppo di ricerca sono le seguenti:

- 1) Ulteriore caratterizzazione *in vitro* dei microRNA analizzati in questo lavoro di tesi e di altri miRNA della *signature* di HCC. Al fine di meglio comprendere il ruolo bio-patologico e delucidare i meccanismi molecolari coinvolti nel processo di trasformazione maligna miRNA-associata, verranno analizzati nuovi bersagli e pathway molecolari ed investigata la suscettibilità a differenti trattamenti farmacologici.
- 2) Caratterizzazione di meccanismi genetici, epigenetici e trascrizionali alla base della deregolazione dei microRNA nell'epatocarcinoma umano. Verranno

impiegate tecniche quali l'immuno-precipitazione della cromatina con anticorpi contro specifici fattori di trascrizione (in collaborazione con il gruppo del Prof. Giovanni Capranico, Università di Bologna) e verrà utilizzata la piattaforma Sequenom per l'indagine dei profili di metilazione di promotori di microRNA deregolati nell'HCC (in collaborazione con il gruppo della Dr.ssa Vilma Mantovani, Policlinico Sant'Orsola-Malpighi di Bologna).

- 3) Sviluppo di modelli animali al fine di valutare i meccanismi molecolari di epatocarcinogenesi miRNA-indotti e di testare l'efficacia e la ridotta tossicità di molecole oligonucleotidiche chimicamente modificate.
- Utilizzo di topi immuno-compromessi per la somministrazione di linee cellulari infettate stabilmente con i microRNA di interesse, al fine di valutarne le capacità tumorigeniche *in vivo*.
 - Sviluppo di un modello animale di topo transgenico per il microRNA-221 al fine di analizzare *in vivo* i meccanismi molecolari coinvolti nel processo di tumorigenesi indotti dal miR-221, da solo o in combinazione con potenti epatocarcinogeni. In seguito allo sviluppo di tumori verranno effettuati trattamenti con molecole antagoniste del miR-221 al fine di testarne l'efficacia anti-tumorale *in vivo* (progetto in collaborazione con il gruppo del Dr. Massimo Negrini dell'Università di Ferrara).
 - Sviluppo di un modello animale di epatocarcinoma al fine di individuare microRNA comuni nell'HCC umano e murino ed al fine di testare *in vivo* l'efficacia e la tossicità di molecole ad attività di miRNA-mimetici o miRNA-antagonisti.

- 4) Individuazione di una *signature* di miRNA circolanti in grado di distinguere pazienti con HCC da pazienti con cirrosi epatica, al fine di identificare marcatori diagnostici in grado di identificare HCC in stadi molto precoci, altrimenti non rivelabili con le comuni tecniche di imaging.

BIBLIOGRAFIA

1. Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., and Pisani, P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 55: 74-108, 2005.
2. Bosh, F.X., Ribes, J., Diaz, M., Cleries, R. Primary liver cancer: worldwid incidence and trends. *Gastroenterology*, 127: S5-16, 2004.
3. Edmondson, H.A., Henderson, B., and Benton, B. Liver-cell adenomas associated with use of oral contraceptives. *N Engl J Med*, 294: 470-472, 1976.
4. Montalto, G., Cervello, M., Giannitrapani, L., Dantona, F., Terranova, A., and Castagnetta, L. A. Epidemiology, risk factors, and natural history of hepatocellular carcinoma. *Ann N Y Acad Sci*, 963: 13-20, 2002.
5. Furuya, K., Nakamura, M., Yamamoto, Y., Toge, K., and Otsuka, H. Macroregenerative nodule of the liver. A clinicopathologic study of 345 autopsy cases of chronic liver disease. *Cancer*, 61: 99-105, 1988.
6. Teoh, N.C. Proliferative drive and liver carcinogenesis: too much of a good thing? *J Gastroenterol Hepatol*, 24: 1817-1825, 2009.
7. Farinati, F., Marino, D., De Giorgio, M., Baldan, A., Cantarini, M., Cursaro, C., Rapaccini, G., Del Poggio, P., Di Nolfo, M.A., Benvegna, L., Zoli, M., Borzio, F., Bernardi, M., and Trevisani, F. Diagnostic and prognostic role of alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma: both or neither? *Am J Gastroenterol*, 101: 524-532, 2006.
8. Befeler, A.S. and Di Bisceglie, A.M. Hepatocellular carcinoma: diagnosis and treatment. *Gastroenterology*, 122: 1609-1619, 2002.
9. Bruix, J., and Sherman, M. Diagnosis of small HCC. *Gastroenterology*, 129: 1364, 2005.
10. Lencioni, R., Cioni, D., Della Pina, C., Crocetti, L., and Bartolozzi, C. Imaging diagnosis. *Semin Liver Dis*, 25: 162-170, 2005.
11. Llovet, J.M. and Bruix, J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology*, 37: 429-442, 2003.
12. Llovet, J.M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Raoul, J., Zeuzem, S., Poulin-Costello, M., Moscovici, M., Voliotis, D., and Bruix J. Sorafenib improves survival in advanced Hepatocellular Carcinoma (HCC): Results of a Phase III randomized placebo-controlled trial. *J Clin Oncol*, 25: LBA1, 2007.
13. Laurent-Puig, P. and Zucman-Rossi, J. Genetics of hepatocellular tumors. *Oncogene*, 25: 3778-3786, 2006.

14. Chiang, D.Y., Villanueva, A., Hoshida, Y., Peix, J., Newell, P., Minguéz, B., LeBlanc, A.C., Donovan, D.J., Thung, S.N., Sole, M., Tovar, V., Alsinet, C., Ramos, A. H., Barretina, J., Roayaie, S., Schwartz, M., Waxman, S., Bruix, J., Mazzaferro, V., Ligon, A. H., Najfeld, V., Friedman, S.L., Sellers, W.R., Meyerson, M., and Llovet, J.M. Focal gains of VEGFA and molecular classification of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, *68*: 6779-6788, 2008.
15. Ladeiro, Y., Couchy, G., Balabaud, C., Bioulac-Sage, P., Pelletier, L., Rebouissou, S., and Zucman-Rossi, J. MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations. *Hepatology*, *47*: 1955-1963, 2008.
16. Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, *75*: 843-854, 1993.
17. Bartel, D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, *116*: 281-297, 2004.
18. Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., and Anderson, T. A. Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact. *Dev Biol*, *289*: 3-16, 2006.
19. Lee, R. C. and Ambros, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, *294*: 862-864, 2001.
20. Brown, J. R. and Sanseau, P. A computational view of microRNAs and their targets. *Drug Discov Today*, *10*: 595-601, 2005.
21. Zhang, B.H., Pan, X.P., Wang, Q.L., Cobb, G P., and Anderson, T.A. Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis. *Cell Res*, *15*: 336-360, 2005.
22. Zhang, B., Pan, X., and Anderson, T.A. Identification of 188 conserved maize microRNAs and their targets. *FEBS Lett*, *580*: 3753-3762, 2006.
23. Ventura, A., Young, A.G., Winslow, M.M., Lintault, L., Meissner, A., Erkeland, S.J., Newman, J., Bronson, R.T., Crowley, D., Stone, J.R., Jaenisch, R., Sharp, P.A., and Jacks, T. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell*, *132*: 875-886, 2008.
24. Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S., and Kim, V.N. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *Embo J*, *21*: 4663-4670, 2002.
25. Kim, V.N., Han, J., and Siomi, M.C. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *10*: 126-139, 2009.

26. Cai, X., Hagedorn, C.H., and Cullen, B.R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, *10*: 1957-1966, 2004.
27. Borchert, G.M., Lanier, W., and Davidson, B.L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*, *13*: 1097-1101, 2006.
28. Lee, Y.S. and Dutta, A. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol*, *4*: 199-227, 2009.
29. Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P.D. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, *115*: 199-208, 2003.
30. Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S.D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, *115*: 209-216, 2003.
31. Lim, L.P., Lau, N.C., Weinstein, E.G., Abdelhakim, A., Yekta, S., Rhoades, M.W., Burge, C.B., and Bartel, D.P. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev*, *17*: 991-1008, 2003.
32. Ambros, V. The functions of animal microRNAs. *Nature*, *431*: 350-355, 2004.
33. Sempere, L.F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E., and Ambros, V. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol*, *5*: R13, 2004.
34. Wienholds, E. and Plasterk, R.H. MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett*, *579*: 5911-5922, 2005.
35. Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., and Croce, C.M. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*: 15524-15529, 2002.
36. Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., and Croce, C.M. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*: 2999-3004, 2004.
37. Weber, B., Stresemann, C., Brueckner, B., and Lyko, F. Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle*, *6*: 1001-1005, 2007.

38. Fazi, F., Racanicchi, S., Zardo, G., Starnes, L.M., Mancini, M., Travaglini, L., Diverio, D., Ammatuna, E., Cimino, G., Lo-Coco, F., Grignani, F., and Nervi, C. Epigenetic silencing of the myelopoiesis regulator microRNA-223 by the AML1/ETO oncoprotein. *Cancer Cell*, *12*: 457-466, 2007.
39. McManus, M.T. MicroRNAs and cancer. *Semin Cancer Biol*, *13*: 253-258, 2003.
40. Volinia, S., Calin, G.A., Liu, C.G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., Prueitt, R.L., Yanaihara, N., Lanza, G., Scarpa, A., Vecchione, A., Negrini, M., Harris, C.C., and Croce, C.M. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*: 2257-2261, 2006.
41. Ma, L., Teruya-Feldstein, J., and Weinberg, R.A. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*, *449*: 682-688, 2007.
42. Li, N., Fu, H., Tie, Y., Hu, Z., Kong, W., Wu, Y., and Zheng, X. miR-34a inhibits migration and invasion by down-regulation of c-Met expression in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett*, *275*: 44-53, 2009.
43. Murakami, Y., Yasuda, T., Saigo, K., Urashima, T., Toyoda, H., Okanoue, T., Shimotohno, K. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene*, *25*: 2537-2545, 2006.
44. Meng, F., Henson, R., Wehbe-Janek, H., Ghoshal, K., Jacob, S.T., Patel, T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*, *133*: 647-658, 2007.
45. Kutay, H., Bai, S., Datta, J., Motiwala, T., Pogribny, I., Frankel, W., Jacob, S.T., Ghoshal, K. Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *J Cell Biochem*, *99*: 371-678, 2006.
46. Pogribny, I.P., Tryndyak, V.P., Boyko, A., Rodriguez-Juarez, R., Beland, F.A., and Kovalchuk, O. Induction of microRNAome deregulation in rat liver by long-term tamoxifen exposure. *Mutat Res*, *619*: 30-37, 2007.
47. Budhu, A., Jia, H., Forgues, M., Liu, C.G., Goldstein, D., Lam, A., Zanetti, K.A., Ye, Q.H., Qin, L.X., Croce, C.M., Tang, Z.Y., and Wang, X.W. Identification of metastasis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, *47*: 897-907, 2008.
48. Varnholt, H., Drebber, U., Schulze, F., Wedemeyer, I., Schirmacher, P., Dienes, H.P., and Odenthal, M. MicroRNA gene expression profile of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, *47*: 1223-1232, 2008.

49. Huang, Y.S., Dai, Y., Yu, X.F., Bao, S.Y., Yin, Y.B., Tang, M., and Hu, C.X. Microarray analysis of microRNA expression in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues without viral hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol*, *23*: 87-94, 2008.
50. Jiang, J., Gusev, Y., Aderca, I., Mettler, T.A., Nagorney, D.M., Brackett, D.J., Roberts, L.R., and Schmittgen, T.D. Association of MicroRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival. *Clin Cancer Res*, *14*: 419-427, 2008.
51. Ura, S., Honda, M., Yamashita, T., Ueda, T., Takatori, H., Nishino, R., Sunakozaka, H., Sakai, Y., Horimoto, K., and Kaneko, S. Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, *49*: 1098-1112, 2009.
52. Braconi, C. and Patel, T. MicroRNA expression profiling: a molecular tool for defining the phenotype of hepatocellular tumors. *Hepatology*, *47*: 1807-1809, 2008.
53. Esau, C., Davis, S., Murray, S.F., Yu, X.X., Pandey, S.K., Pear, M., Watts, L., Booten, S.L., Graham, M., McKay, R., Subramaniam, A., Propp, S., Lollo, B.A., Freier, S., Bennett, C.F., Bhanot, S., and Monia, B.P. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab*, *3*: 87-98, 2006.
54. Krutzfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K.G., Tuschl, T., Manoharan, M., and Stoffel, M. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*, *438*: 685-689, 2005.
55. Jopling, C.L., Yi, M., Lancaster, A.M., Lemon, S.M., and Sarnow, P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*, *309*: 1577-1581, 2005.
56. Kim, S., Lee, U.J., Kim, M.N., Lee, E.J., Kim, J.Y., Lee, M.Y., Chung, S., Kim, Y.J., and Choi, Y.C. MicroRNA miR-199a* regulates the MET proto-oncogene and the downstream extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2). *J Biol Chem*, *283*: 18158-18166, 2008.
57. Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., Downing, J. R., Jacks, T., Horvitz, H.R., and Golub, T.R. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, *435*: 834-838, 2005.
58. Fulci, V., Chiaretti, S., Goldoni, M., Azzalin, G., Carucci, N., Tavolaro, S., Castellano, L., Magrelli, A., Citarella, F., Messina, M., Maggio, R., Peragine, N., Santangelo, S., Mauro, F.R., Landgraf, P., Tuschl, T., Weir, D.B., Chien, M., Russo, J.J., Ju, J., Sheridan, R., Sander, C., Zavolan, M., Guarini, A., Foa, R., and Macino, G. Quantitative technologies establish a

- novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *109*: 4944-4951, 2007.
59. Yanaihara, N., Caplen, N., Bowman, E., Seike, M., Kumamoto, K., Yi, M., Stephens, R.M., Okamoto, A., Yokota, J., Tanaka, T., Calin, G.A., Liu, C.G., Croce, C.M., and Harris, C.C. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*, *9*: 189-198, 2006.
 60. Calin, G.A., Ferracin, M., Cimmino, A., Di Leva, G., Shimizu, M., Wojcik, S. E., Iorio, M.V., Visone, R., Sever, N.I., Fabbri, M., Iuliano, R., Palumbo, T., Pichiorri, F., Roldo, C., Garzon, R., Sevignani, C., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C.G., Kipps, T.J., Negrini, M., and Croce, C.M. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, *353*: 1793-1801, 2005.
 61. Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Harano, T., Yatabe, Y., Nagino, M., Nimura, Y., Mitsudomi, T., and Takahashi, T. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res*, *64*: 3753-3756, 2004.
 62. Johnson, S.M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K.L., Brown, D., and Slack, F.J. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, *120*: 635-647, 2005.
 63. Johnson, C.D., Esquela-Kerscher, A., Stefani, G., Byrom, M., Kelnar, K., Ovcharenko, D., Wilson, M., Wang, X., Shelton, J., Shingara, J., Chin, L., Brown, D., and Slack, F.J. The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res*, *67*: 7713-7722, 2007.
 64. Garofalo, M., Di Leva, G., Romano, G., Nuovo, G., Suh, S.S., Ngankek, A., Taccioli, C., Pichiorri, F., Alder, H., Secchiero, P., Gasparini, P., Gonelli, A., Costinean, S., Acunzo, M., Condorelli, G., and Croce, C.M. miR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 downregulation. *Cancer Cell*, *16*: 498-509, 2009.
 65. Meng, F., Henson, R., Lang, M., Wehbe, H., Maheshwari, S., Mendell, J. T., Jiang, J., Schmittgen, T.D., and Patel, T. Involvement of human microRNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology*, *130*: 2113-2129, 2006.
 66. Weidhaas, J.B., Babar, I., Nallur, S.M., Trang, P., Roush, S., Boehm, M., Gillespie, E., and Slack, F.J. MicroRNAs as potential agents to alter resistance to cytotoxic anticancer therapy. *Cancer Res*, *67*: 11111-11116, 2007.

67. Orom, U.A., Kauppinen, S., and Lund, A.H. LNA-modified oligonucleotides mediate specific inhibition of microRNA function. *Gene*, *372*: 137-141, 2006.
68. Weiler, J., Hunziker, J., and Hall, J. Anti-miRNA oligonucleotides (AMOs): ammunition to target miRNAs implicated in human disease? *Gene Ther*, *13*: 496-502, 2006.
69. Dykxhoorn, D.M., Palliser, D., and Lieberman, J. The silent treatment: siRNAs as small molecule drugs. *Gene Ther*, *13*: 541-552, 2006.
70. Tibshirani, R., Hastie, T., Narasimhan, B., and Chu, G. Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*: 6567-6572, 2002.
71. Furey, T.S., Cristianini, N., Duffy, N., Bednarski, D.W., Schummer, M., and Haussler, D. Support vector machine classification and validation of cancer tissue samples using microarray expression data. *Bioinformatics*, *16*: 906-914, 2000.
72. Negrini, M., Ferracin, M., Sabbioni, S., and Croce, C.M. MicroRNAs in human cancer: from research to therapy. *J Cell Sci*, *120*: 1833-1840, 2007.
73. Llovet, J.M., Burroughs, A., and Bruix, J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*, *362*: 1907-1917, 2003.
74. Edmondson, H.A. and Steiner, P.E. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer*, *7*: 462-503, 1954.
75. Liu, C.G., Calin, G.A., Meloon, B., Gamliel, N., Sevignani, C., Ferracin, M., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Zupo, S., Dono, M., Alder, H., Bullrich, F., Negrini, M., and Croce, C.M. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*: 9740-9744, 2004.
76. Felli, N., Fontana, L., Pelosi, E., Botta, R., Bonci, D., Facchiano, F., Liuzzi, F., Lulli, V., Morsilli, O., Santoro, S., Valtieri, M., Calin, G.A., Liu, C.G., Sorrentino, A., Croce, C.M., and Peschle, C. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*: 18081-18086, 2005.
77. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol*, *12*: 735-739, 2002.
78. Okamoto, K. and Beach, D. Cyclin G is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein. *Embo J*, *13*: 4816-4822, 1994.

79. Zauberman, A., Lupo, A., Oren M. Identification of p53 target genes through immune selection of genomic DNA: the cyclin G gene contains two distinct p53 binding sites. *Oncogene*, *10*: 2361-2366, 1995.
80. Okamoto, K., Li, H., Jensen, M.R., Zhang, T., Taya, Y., Thorgeirsson, S.S., and Prives, C. Cyclin G Recruits PP2A to Dephosphorylate Mdm2. *Mol Cell*, *9*: 761-777, 2002.
81. Smith, M.L., Kontny, H., Bortnick, R., and Fornace A.J. Jr. The p53-regulated cyclin G gene promotes cell growth: p53 downstream effectors cyclin G and Gadd45 exert different effects on cisplatin chemosensitivity. *Exp Cell Res*, *230*: 61-68, 1997.
82. Skotzko M, W. L., Anderson WF, Gordon EM, Hall FL Retroviral vector-mediated gene transfer of antisense cyclin G1 (CYCG1) inhibits proliferation of human osteogenic sarcoma cells. *Cancer research*, *55*: 5493-5498, 1995.
83. Reimer, C.L., Borrás, A.M., Kurdistani, S.K., Garreau, J.R., Chung, M., Stuart, A.A., and Lee, S.W. Altered Regulation of Cyclin G in Human Breast Cancer and Its Specific Localization at Replication Foci in Response to DNA Damage in p53/1 Cells. *J Biol Chem*, *274*: 11022-11029, 1999.
84. Baek, W.K., Kim, D., Jung, N., Yi Y.W., Kim, J.M., Cha, S.D., Bae, I., and Cho, C.H. Increased expression of cyclin G1 in leiomyoma compared with normal myometrium. *Gynecology*, *188*: 634-639, 2003.
85. Jensen, M.R., Factor, V.M., and Thorgeirsson, S.S. Regulation of cyclin G1 during murine hepatic regeneration following Dipin-induced DNA damage. *Hepatology*, *28*: 537-546, 1998.
86. Kimura, S.H., Ikawa, M., Ito, A., Okabe, M., and Nojima, H. Cyclin G1 is involved in G2/M arrest in response to DNA damage and in growth control after damage recovery. *Oncogene*, *20*: 3290-3300, 2001.
87. Zhao, L., Samuels, T., Winckler, S., Korgaonkar, C., Tompkins, V., Horne, M.C., and Quelle, D.E. Cyclin G1 has growth inhibitory activity linked to the ARF-Mdm2-53 and pRb tumor suppressor pathways. *Mol Cancer Res*, *1*: 195-206, 2003.
88. Jensen, M.R. Factor, V.M., Fantozzi, A., Helin, K., Huh, C.G, and Thorgeirsson, S.S. Reduced Hepatic Tumor Incidence in Cyclin G1-Deficient Mice. *Hepatology*, *37*: 862-870, 2003.
89. Laurent-Puig, P., Legoux, P., Bluteau, O., Belghiti, J., Franco, D., Binot, F., Monges, G., Thomas, G., Bioulac-Sage, P., and Zucman-Rossi, J. Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define

- distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology*, *120*: 1763-1773, 2001.
90. Thompson, T., Tovar, C., Yang, H., Carvajal, D., Vu, B.T., Xu, Q., Wahl, G. M., Heimbrook, D.C., and Vassilev, L.T. Phosphorylation of p53 on key serines is dispensable for transcriptional activation and apoptosis. *J Biol Chem*, *279*: 53015-53022, 2004.
 91. Okamoto, K., Kamibayashi, C., Serrano, M., Prives, C., Mumby, M. C., and Beach, D. p53-dependent association between cyclin G and the B' subunit of protein phosphatase 2A. *Mol Cell Biol*, *16*: 6593-6602, 1996.
 92. Chen, X. Cyclin G: a regulator of the p53-Mdm2 network. *Dev Cell*, *2*: 518-519, 2002.
 93. Theard, D., Raspe, M. A., Kalicharan, D., Hoekstra, D., and van IJzendoorn, S.C. Formation of E-cadherin/beta-catenin-based adherens junctions in hepatocytes requires serine-10 in p27(Kip1). *Mol Biol Cell*, *19*: 1605-1613, 2008.
 94. Lee, T.K., Lau, T.C., and Ng, I.O. Doxorubicin-induced apoptosis and chemosensitivity in hepatoma cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol*, *49*: 78-86, 2002.
 95. Ciafre, S.A., Galardi, S., Mangiola, A., Ferracin, M., Liu, C.G., Sabatino, G., Negrini, M., Maira, G., Croce, C.M., and Farace, M.G. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun*, *334*: 1351-1358, 2005.
 96. Gottardo, F., Liu, C.G., Ferracin, M., Calin, G. A., Fassan, M., Bassi, P., Sevignani, C., Byrne, D., Negrini, M., Pagano, F., Gomella, L.G., Croce, C.M., and Baffa, R. Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers. *Urol Oncol*, *25*: 387-392, 2007.
 97. He, H., Jazdzewski, K., Li, W., Liyanarachchi, S., Nagy, R., Volinia, S., Calin, G.A., Liu, C.G., Franssila, K., Suster, S., Kloos, R.T., Croce, C.M., and de la Chapelle, A. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*: 19075-19080, 2005.
 98. Lee, E.J., Gusev, Y., Jiang, J., Nuovo, G.J., Lerner, M.R., Frankel, W.L., Morgan, D.L., Postier, R.G., Brackett, D.J., and Schmittgen, T.D. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int J Cancer*, *120*: 1046-1054, 2007.
 99. Galardi, S., Mercatelli, N., Giorda, E., Massalini, S., Frajese, G.V., Ciafre, S.A., and Farace, M.G. miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1. *J Biol Chem*, *282*: 23716-23724, 2007.

100. Le Sage, C., Nagel, R., Egan, D. A., Schrier, M., Mesman, E., Mangiola, A., Anile, C., Maira, G., Mercatelli, N., Ciafre, S.A., Farace, M.G., and Agami, R. Regulation of the p27(Kip1) tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation. *Embo J*, 26: 3699-3708, 2007.
101. Gillies, J.K. and Lorimer, I.A. Regulation of p27Kip1 by miRNA 221/222 in glioblastoma. *Cell Cycle*, 6: 2005-2009, 2007.
102. Visone, R., Russo, L., Pallante, P., De Martino, I., Ferraro, A., Leone, V., Borbone, E., Petrocca, F., Alder, H., Croce, C.M., and Fusco, A. MicroRNAs (miR)-221 and miR-222, both overexpressed in human thyroid papillary carcinomas, regulate p27Kip1 protein levels and cell cycle. *Endocr Relat Cancer*, 14: 791-798, 2007.
103. Tannapfel, A., Grund, D., Katalinic, A., Uhlmann, D., Kockerling, F., Haugwitz, U., Wasner, M., Hauss, J., Engeland, K., and Wittekind, C. Decreased expression of p27 protein is associated with advanced tumor stage in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, 89: 350-355, 2000.
104. Ito, Y., Takeda, T., Sakon, M., Tsujimoto, M., Monden, M., and Matsuura, N. Expression of p57/Kip2 protein in hepatocellular carcinoma. *Oncology*, 61: 221-225, 2001.
105. Nakai, S., Masaki, T., Shiratori, Y., Ohgi, T., Morishita, A., Kurokohchi, K., Watanabe, S., and Kuriyama, S. Expression of p57(KIP2) in hepatocellular carcinoma: relationship between tumor differentiation and patient survival. *Int J Oncol*, 20: 769-775, 2002.
106. Schwienbacher, C., Gramantieri, L., Scelfo, R., Veronese, A., Calin, G.A., Bolondi, L., Croce, C.M., Barbanti-Brodano, G., and Negrini, M. Gain of imprinting at chromosome 11p15: a pathogenetic mechanism identified in human hepatocarcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 5445-5449, 2000.
107. Diaz-Meyer, N., Day, C.D., Khatod, K., Maher, E.R., Cooper, W., Reik, W., Junien, C., Graham, G., Algar, E., Der Kaloustian, V.M., and Higgins, M.J. Silencing of CDKN1C (p57KIP2) is associated with hypomethylation at KvDMR1 in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet*, 40: 797-801, 2003.
108. Soejima, H., Nakagawachi, T., Zhao, W., Higashimoto, K., Urano, T., Matsukura, S., Kitajima, Y., Takeuchi, M., Nakayama, M., Oshimura, M., Miyazaki, K., Joh, K., and Mukai, T. Silencing of imprinted CDKN1C gene expression is associated with loss of CpG and histone H3 lysine 9 methylation at DMR-LIT1 in esophageal cancer. *Oncogene*, 23: 4380-4388, 2004.

109. Fabregat, I., Roncero, C., and Fernandez, M. Survival and apoptosis: a dysregulated balance in liver cancer. *Liver Int*, 27: 155-162, 2007.
110. Guo, X.Z., Shao, X.D., Liu, M.P., Xu, J.H., Ren, L.N., Zhao, J.J., Li, H. Y., and Wang, D. Effect of bax, bcl-2 and bcl-xL on regulating apoptosis in tissues of normal liver and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 8: 1059-1062, 2002.
111. Schattenberg, J.M., Galle, P.R., and Schuchmann, M. Apoptosis in liver disease. *Liver Int*, 26: 904-911, 2006.
112. Willis, S.N. and Adams, J.M. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*, 17: 617-625, 2005.
113. Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L.A., Beaumont, J., Coultas, L., Cheney, R.E., Huang, D.C., and Strasser, A. Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science*, 293: 1829-1832, 2001.
114. Schmelzle, T., Mailleux, A.A., Overholtzer, M., Carroll, J.S., Solimini, N.L., Lightcap, E.S., Veiby, O.P., Brugge, J.S. Functional role and oncogene-regulated expression of the BH3-only factor Bmf in mammary epithelial anoikis and morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 3787-3792, 2007.
115. Imamura, H., Matsuyama, Y., Tanaka, E., Ohkubo, T., Hasegawa, K., Miyagawa, S., Sugawara, Y., Minagawa, M., Takayama, T., Kawasaki, S., and Makuuchi, M. Risk factors contributing to early and late phase intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *J Hepatol*, 38: 200-207, 2003.
116. Iorio, M.V., Visone, R., Di Leva, G., Donati, V., Petrocca, F., Casalini, P., Taccioli, C., Volinia, S., Liu, C.G., Alder, H., Calin, G. A., Menard, S., and Croce, C.M. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res*, 67: 8699-8707, 2007.
117. Ichimi, T., Enokida, H., Okuno, Y., Kunimoto, R., Chiyomaru, T., Kawamoto, K., Kawahara, K., Toki, K., Kawakami, K., Nishiyama, K., Tsujimoto, G., Nakagawa, M., and Seki, N. Identification of novel microRNA targets based on microRNA signatures in bladder cancer. *Int J Cancer*, 125: 345-352, 2009.
118. Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A. O., Landthaler, M., Lin, C., Socci, N. D., Hermida, L., Fulci, V., Chiaretti, S., Foa, R., Schliwka, J., Fuchs, U., Novosel, A., Muller, R.U., Schermer, B., Bissels, U., Inman, J., Phan, Q., Chien, M., Weir, D.B., Choksi, R., De Vita, G., Frezzetti, D., Trompeter, H. I., Hornung, V., Teng, G., Hartmann, G., Palkovits, M., Di Lauro, R., Wernet, P., Macino, G., Rogler, C.E., Nagle, J.W., Ju, J., Papavasiliou, F.

- N., Benzing, T., Lichter, P., Tam, W., Brownstein, M.J., Bosio, A., Borkhardt, A., Russo, J.J., Sander, C., Zavolan, M., and Tuschl, T. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*, *129*: 1401-1414, 2007.
119. Migliore, C., Petrelli, A., Ghiso, E., Corso, S., Capparuccia, L., Eramo, A., Comoglio, P. M., and Giordano, S. MicroRNAs impair MET-mediated invasive growth. *Cancer Res*, *68*: 10128-10136, 2008.
 120. Dolganiuc, A., Petrasek, J., Kodys, K., Catalano, D., Mandrekar, P., Velayudham, A., and Szabo, G. MicroRNA Expression Profile in Lieber-DeCarli Diet-Induced Alcoholic and Methionine Choline Deficient Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis Models in Mice. *Alcohol Clin Exp Res*, 2009.
 121. Lin, E.A., Kong, L., Bai, X.H., Luan, Y., and Liu, C.J. miR-199a, a bone morphogenic protein 2-responsive MicroRNA, regulates chondrogenesis via direct targeting to Smad1. *J Biol Chem*, *284*: 11326-11335, 2009.
 122. Oskowitz, A.Z., Lu, J., Penforis, P., Ylostalo, J., McBride, J., Flemington, E.K., Prockop, D.J., and Pochampally, R. Human multipotent stromal cells from bone marrow and microRNA: regulation of differentiation and leukemia inhibitory factor expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*: 18372-18377, 2008.
 123. Vignot, S., Faivre, S., Aguirre, D., and Raymond, E. mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. *Ann Oncol*, *16*: 525-537, 2005.
 124. Villanueva, A., Chiang, D.Y., Newell, P., Peix, J., Thung, S., Alsinet, C., Tovar, V., Roayaie, S., Minguez, B., Sole, M., Battiston, C., Van Laarhoven, S., Fiel, M.I., Di Feo, A., Hoshida, Y., Yea, S., Toffanin, S., Ramos, A., Martignetti, J. A., Mazzaferro, V., Bruix, J., Waxman, S., Schwartz, M., Meyerson, M., Friedman, S.L., and Llovet, J.M. Pivotal role of mTOR signaling in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, *135*: 1972-1983, 1983 e1971-1911, 2008.
 125. Meric-Bernstam, F. and Gonzalez-Angulo, A.M. Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy. *J Clin Oncol*, *27*: 2278-2287, 2009.
 126. Zhou, L., Huang, Y., Li, J., and Wang, Z. The mTOR pathway is associated with the poor prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Med Oncol*, 2009.
 127. Huynh, H., Chow, K. H., Soo, K. C., Toh, H.C., Choo, S.P., Foo, K.F., Poon, D., Ngo, V.C., and Tran, E. RAD001 (everolimus) inhibits tumour growth in xenograft models of human hepatocellular carcinoma. *J Cell Mol Med*, *13*: 1371-1380, 2009.

128. Piguet, A.C., Semela, D., Keogh, A., Wilkens, L., Stroka, D., Stoupis, C., St-Pierre, M.V., and Dufour, J.F. Inhibition of mTOR in combination with doxorubicin in an experimental model of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, *49*: 78-87, 2008.
129. Buitrago-Molina, L.E., Pothiraju, D., Lamle, J., Marhenke, S., Kossatz, U., Breuhahn, K., Manns, M. P., Malek, N., and Vogel, A. Rapamycin delays tumor development in murine livers by inhibiting proliferation of hepatocytes with DNA damage. *Hepatology*, *50*: 500-509, 2009.
130. Land, S.C. and Tee, A.R. Hypoxia-inducible factor 1alpha is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR signaling motif. *J Biol Chem*, *282*: 20534-20543, 2007.
131. Rane, S., He, M., Sayed, D., Vashistha, H., Malhotra, A., Sadoshima, J., Vatner, D.E., Vatner, S.F., and Abdellatif, M. Downregulation of miR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1alpha and Sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes. *Circ Res*, *104*: 879-886, 2009.
132. Comoglio, P.M. and Trusolino, L. Invasive growth: from development to metastasis. *J Clin Invest*, *109*: 857-862, 2002.
133. Iorio, M.V., Ferracin, M., Liu, C.G., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., Magri, E., Pedriali, M., Fabbri, M., Campiglio, M., Menard, S., Palazzo, J.P., Rosenberg, A., Musiani, P., Volinia, S., Nenci, I., Calin, G. A., Querzoli, P., Negrini, M., and Croce, C. M. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*, *65*: 7065-7070, 2005.
134. Pineau, P., Volinia, S., McJunkin, K., Marchio, A., Battiston, C., Terris, B., Mazzaferro, V., Lowe, S.W., Croce, C.M., and Dejean, A. miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*: 264-269.
135. Pallante, P., Visone, R., Ferracin, M., Ferraro, A., Berlingieri, M. T., Troncone, G., Chiappetta, G., Liu, C. G., Santoro, M., Negrini, M., Croce, C.M., and Fusco, A. MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. *Endocr Relat Cancer*, *13*: 497-508, 2006.
136. Gramantieri, L., Ferracin, M., Fornari, F., Veronese, A., Sabbioni, S., Liu, C.G., Calin, G.A., Giovannini, C., Ferrazzi, E., Grazi, G.L., Croce, C.M., Bolondi, L., and Negrini, M. Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, *67*: 6092-6099, 2007.
137. Cummins, J.M., He, Y., Leary, R.J., Pagliarini, R., Diaz, L.A. Jr., Sjoblom, T., Barad, O., Bentwich, Z., Szafranska, A.E., Labourier, E., Raymond, C.K., Roberts, B.S., Juhl, H., Kinzler, K.W., Vogelstein, B.,

and Velculescu, V.E. The colorectal microRNAome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*: 3687-3692, 2006.

138. Fornari, F., Gramantieri, L., Giovannini, C., Veronese, A., Ferracin, M., Sabbioni, S., Calin, G. A., Grazi, G.L., Croce, C.M., Tavalari, S., Chieco, P., Negrini, M., and Bolondi, L. MiR-122/cyclin G1 interaction modulates p53 activity and affects doxorubicin sensitivity of human hepatocarcinoma cells. *Cancer Res*, *69*: 5761-5767, 2009.
139. Tong, A.W. and Nemunaitis, J. Modulation of miRNA activity in human cancer: a new paradigm for cancer gene therapy? *Cancer Gene Ther*, *15*: 341-355, 2008.
140. Sarasin-Filipowicz, M., Krol, J., Markiewicz, I., Heim, M.H., and Filipowicz, W. Decreased levels of microRNA miR-122 in individuals with hepatitis C responding poorly to interferon therapy. *Nat Med*, *15*: 31-33, 2009.
141. Song, E., Lee, S.K., Wang, J., Ince, N., Ouyang, N., Min, J., Chen, J., Shankar, P., and Lieberman, J. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med*, *9*: 347-351, 2003.
142. Elmen, J., Lindow, M., Schutz, S., Lawrence, M., Petri, A., Obad, S., Lindholm, M., Hedtjarn, M., Hansen, H.F., Berger, U., Gullans, S., Kearney, P., Sarnow, P., Straarup, E. M., and Kauppinen, S. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature*, *452*: 896-899, 2008.
143. Elmen, J., Lindow, M., Silaharoglu, A., Bak, M., Christensen, M., Lind-Thomsen, A., Hedtjarn, M., Hansen, J.B., Hansen, Straarup, E.M., McCullagh, K., Kearney, P., and Kauppinen, S. Antagonism of microRNA-122 in mice by systemically administered LNA-antimiR leads to up-regulation of a large set of predicted target mRNAs in the liver. *Nucleic Acids Res*, *36*: 1153-1162, 2008.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Prof. Giovanni Capranico per avermi ‘adottato’ nel suo gruppo di ricerca e consentito di portare a termine questo percorso di Dottorato, che si è rivelato molto istruttivo e che mi ha consentito di crescere sia scientificamente che umanamente.

Ringrazio il Prof. Luigi Bolondi per aver avuto fiducia in me sin dall’inizio e per avermi dato l’opportunità di fare ricerca ad altissimi livelli e soprattutto la ricerca che avevo sempre sognato dal primo giorno di Università.

Ringrazio in particolar modo la Dr.ssa Laura Gramantieri che più di tutti ha creduto in me e mi ha sostenuto anche quando gli esperimenti non ne volevano sapere di andare per il verso giusto ed il laboratorio sembrava un buco nero. Poi però ci siamo prese le nostre rivincite e adesso non ci ferma più nessuno! Grazie di cuore per tutto quello che hai fatto per me!

Ringrazio il Dr. Massimo Negrini, il mio mentore, per avermi dato fiducia in quel lontano colloquio del 2005 e per avermi aperto le porte dell’affascinante ‘mondo dei microRNA’.

Ringrazio il Dr. Chieco per avermi offerto l’opportunità di lavorare in un laboratorio (CRBA) così all’avanguardia, che quasi non sembra neanche di essere in Italia!

Ringrazio i miei genitori e mia sorella Chiara che pur considerandomi una ‘scienziata pazza’ hanno gioito insieme a me delle soddisfazioni che questo lavoro mi ha offerto.

Ringrazio Matteo che mi è stato vicino e mi ha sempre incoraggiata, infondendomi autostima e desiderio di farcela a tutti i costi e, anche se a volte le gambe mi tremavano un poco, sono contenta della mie conquiste e di dividerle con chi mi vuole bene.

Ringrazio i due pilastri che quotidianamente mi sostengono, Maddalena e Manuela, a cui spero di aver insegnato qualcosa e soprattutto trasmesso l'amore per la ricerca che è spesso avara di soddisfazioni, ma che è così affascinante anche per questo suo metterti costantemente alla prova. Ed alla fine sono convinta che le risposte sono proprio lì, dove non te le saresti mai aspettate, a prendersi gioco del tuo tanto cercare...il segreto consiste proprio nel non mollare mai!
Forza ragazze!

Ringrazio tutte le mie amiche per avermi strappato un sorriso anche quando c'era solo il buio e per aver condiviso con me gioie e dolori e soprattutto perché so che ci siete sempre, anche quando siete lontane...

Ringrazio tutti i miei nonni, vicini e 'lontani', che ancora si commuovono quando dico loro che ho vinto un premio ad un congresso, e che sono un esempio quotidiano di resistenza e di ingegno!

Grazie a tutti per avermi consentito di raccontare questa storia!