

Dottorato di ricerca in
Biologia Cellulare, Molecolare e Industriale,
Progetto 1 - Biologia e Fisiologia Cellulare
XXV ciclo

Settore Concorsuale 05/D1

Settore Scientifico Disciplinare BIO/09

CARATTERIZZAZIONE DEL SOPPRESSORE TUMORALE MIR-101 NEL COLON CARCINOMA

Relatore:

**Chiar.mo Prof.
Antonio Contestabile**

Presentata da:

Dr.ssa Cinzia Caggiano

Coordinatore Dottorato:

**Chiar.ma Prof.ssa
Michela Rugolo**

Correlatore:

Dott. Enzo Spisni

INDICE

<u>INTRODUZIONE</u>	3
1. GENOMICA E BIOGENESI DEI MIRNA	3
2. FUNZIONE CELLULARE E MECCANISMO D’AZIONE	7
3. REGOLAZIONE DELLA FUNZIONE DEI MIRNA	9
4. REGOLAZIONE DELL’ESPRESSIONE DEI MIRNA	10
• REGOLAZIONE TRASCRIZIONALE DELL’ESPRESSIONE DEI MIRNA	12
• REGOLAZIONE POST-TRASCRIZIONALE DELL’ESPRESSIONE DEI MIRNA	14
5. MICRORNA E TUMORI	16
6. CARCINOMA DEL COLON-RETTO	18
7. HSA-MIR-101	22
<u>SCOPO DEL LAVORO</u>	27
<u>MATERIALI E METODI</u>	28
8. COLTURE CELLULARI	28
9. ESTRAZIONE DELL’RNA TOTALE DA CELLULE	28
10. PREPARAZIONE DEL GEL DI AGAROSIO PER L’ANALISI DI ACIDI NUCLEICI	29
11. MARCATURA DI OLIGONUCLEOTIDI ALL’ESTREMITÀ 5’	29
12. PRIMER EXTENSION	30
13. NORTHERN BLOT	32
14. RAPID AMPLIFICATION OF cDNA ENDS (3’RACE)	34
15. CLONAGGIO DEI PROMOTORI GENICI	35
• ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO	36
• AMPLIFICAZIONE DEL DNA MEDIANTE PCR	36
• CLONAGGIO	37

• TRASFORMAZIONE DEI BATTERI COMPETENTI.....	39
• SCREENING DELLE COLONIE TRASFORMATE	39
• TRANSFEZIONE TRANSIENTE	40
• SAGGIO DI LUCIFERASI	40
16. IMMUNOPRECIPITAZIONE DELLA CROMATINA.....	41
17. REAL TIME PCR	43
18. ANALISI STATISTICA	45
<u>RISULTATI.....</u>	<u>46</u>
19. IDENTIFICAZIONE DEI TRASCRITTI PRIMARI DEL miR-101	46
• STUDIO BIOINFORMATICO DI PREDIZIONE	46
20. IDENTIFICAZIONE DEL TRASCRITTO PRIMARIO DEL miR-101-1	52
• LA LUNGHEZZA DEL PRI-miR-101-1	52
• L'ESTREMITÀ 3' DEL PRI-miR-101-1	55
• L'ESTREMITÀ 5' DEL PRI-miR-101-1	55
• IL PROMOTORE GENICO DEL miR-101-1	57
21. IDENTIFICAZIONE DEL TRASCRITTO PRIMARIO DEL miR-101-2	58
22. L'ESPRESSIONE DEL miR-101 È REGOLATA IN MODO DIRETTO DALLA B-CATENINA ...	60
23. L'ESPRESSIONE DEL miR-101 È REGOLATA DURANTE L'INFIAMMAZIONE	61
<u>DISCUSSIONE.....</u>	<u>63</u>
<u>CONCLUSIONI.....</u>	<u>66</u>
<u>BIBLIOGRAFIA.....</u>	<u>67</u>

INTRODUZIONE

I microRNA (miRNA) sono piccole molecole di RNA non codificante a singolo filamento di circa 20-24 nucleotidi, che regolano l'espressione genica a livello post-trascrizionale. Sono sfuggiti ai ricercatori per decenni fino alla scoperta del miRNA detto "lin-4" necessario per il corretto sviluppo temporale delle larve del nematode *Caenorhabditis elegans*. Fu proposto che lin-4 bloccasse, attraverso parziale complementarità con sequenze non codificanti al 3' terminale (3'UTR), la traduzione dell'RNA messaggero per lin-14, una proteina la cui continua sintesi abrogava il corretto sviluppo temporale delle larve (Lee et al., 1993). Con la loro scoperta il concetto di regolazione genica è stato rivisto e la famiglia dei miRNA ha acquisito un posto centrale nei networks di regolazione post-trascrizionale, sia negativa che positiva. In 20 anni il numero di miRNA umani conosciuti è salito a 2237, come riporta il database miRBase (www.mirbase.org; Griffiths-Jones, 2012), ma la regolazione dell'espressione, la funzione cellulare, le implicazioni fisiologiche e patologiche non sono ancora del tutto comprese e sviluppate per ogni miRNA.

GENOMICA E BIOGENESI DEI MIRNA

Circa il 96% del genoma umano è composto da DNA non codificante, necessario alla trascrizione di rRNA, tRNA, snRNA, snoRNA, scRNA e miRNA (De Leo, *Biologia e Genetica II Ed.*). I geni dei miRNA costituiscono l'1-4% del genoma e sono localizzati per il 50% in regioni intergeniche, per il 40% in regioni intrageniche introniche e il per il 10% in regioni intrageniche esoniche (Donal O'Carroll and Anne Schaefer, 2013). I miRNA intergenici posseggono propri promotori ed enhancer, mentre la trascrizione dei miRNA

intergenici può dipendere anche dal promotore del gene ospite. Molti di questi miRNA sono raggruppati in cluster, cioè codificati da trascritti policistronici, successivamente processati per formare i singoli miRNA (Zhao and Srivastava, 2007).

La maggior parte dei microRNA viene trascritta dalla RNA polimerasi II (RNA PolII), sebbene un minor gruppo di miRNA associati a sequenze ripetute (Alu) possa essere trascritto dalla RNA PolIII (David L. et al., 2009). Il processo canonico di maturazione dei miRNA prevede un doppio passaggio di maturazione in entrambi i compartimenti nucleare e citoplasmatico da parte di 2 complessi enzimatici della famiglia dell'RNasi III.

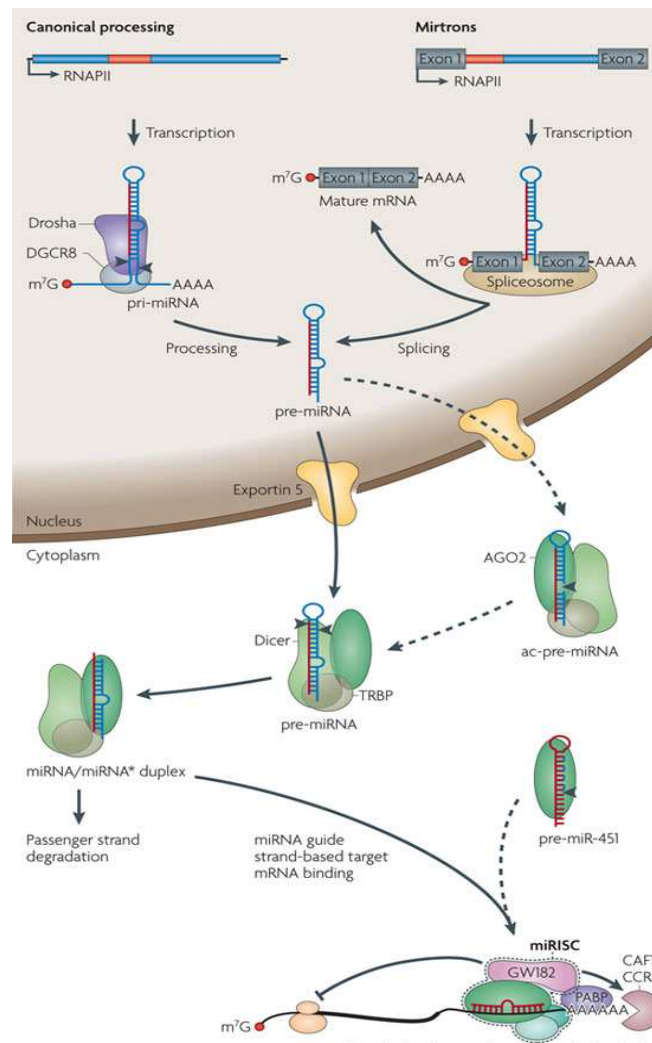


Figura 1. Biogenesi dei microRNA (Jacek Krol et al., 2010).

Il trascritto primario dei miRNA (detto pri-miRNA) è lungo da centinaia a migliaia di basi ed è caratterizzato da una complessa struttura a forcina, poliadenilazione e cappuccio di 7-metilguanosa (Xuezhong Cai et al., 2004). La struttura a forcina ha caratteristiche uniche per i pri-miRNA e ne permette la distinzione da altre strutture presenti nel nucleo. In particolare comprende una regione di appaiamento imperfetto di circa 30 nucleotidi con alla base una regione a singolo filamento detta regione di giunzione (Julia Starega-Roslan et al., 2011). Nel nucleo co-trascrizionalmente la regione di giunzione del pri-miRNA è riconosciuta e legata dalla proteina DiGeorge syndrome critical region 8 (DGCR8) che ha un dominio di legame ai dsRNA (dsRBP) (Monica Ballarino et al., 2009). Successivamente il reclutamento della proteina RNasi III Drosha ne permette la processazione ad un giro d'elica dalla giunzione, rilasciando il pre-miRNA della lunghezza di circa 70 nucleotidi con una estremità 3' sporgente di 2 nucleotidi, caratteristica delle RNasi III (Martin A. Newman and Scott M. Hammond, 2010; Han J et al. 2006). Non è ancora del tutto chiaro quali siano le caratteristiche strutturali necessarie del pri-miRNA ed i cofattori che partecipano a tale passaggio di maturazione. Molteplici evidenze descrivono che l'efficienza della processazione dipende dalla grandezza e sequenza dell'ansa, dalla struttura della forcina e dalle sequenze fiancheggianti il sito di taglio. Ciò è dimostrato anche dal fatto che mutazioni in queste regioni inibiscono in maniera significativa l'attività di Drosha. Inoltre diverse proteine come RNA elicasi e ribonucleoproteine nucleari eterogenee (hnRNP) sono associate al microprocessore Drosha (Michlewski et al., 2008). I pre-miRNA vengono riconosciuti in modo specifico ed esportati dal nucleo al citoplasma attraverso un meccanismo mediato da un membro della famiglia delle proteine karyopherine detta Exportina 5, in cooperazione con la proteina guanina trifosfatasi (GTPasi) Ran (Bohnsack et al., 2004). Nel citoplasma il pre-miRNA è quindi incorporato nel complesso di caricamento a RISC (RLC), i cui componenti principali sono Dicer, Ago,

e la proteina dsRBP detta trans-activation response RNA-binding protein (TRBP), mediante un meccanismo ATP-dipendente da parte degli chaperon molecolari Hsc70/Hsp90. L'RNAse III Dicer riconosce il 3' sporgente del pre-miRNA e opera un taglio a 2 giri di elica dal 3' sporgente, generando una molecola a doppio filamento di RNA di 20-25 paia di basi che contiene il miRNA maturo (filamento guida) ed il suo complementare *miRNA** (Starega-Roslan J et al., 2011). Questo duplex miRNA/miRNA* non perfettamente appaiato è trasferito alla proteina Argonaute (Ago) che avvierà la degradazione del miRNA*. La presenza di mismatch nelle posizioni 2-8-12-16 del filamento guida favorisce l'attività endonucleolitica di Ago2 che digerisce solo il filamento termodinamicamente più instabile (Xuhang Liu et al., 2012; Yoosik Kim and V. Narry Kim, 2012). Alcune evidenze sperimentali indicano come diversi fattori tessuto-specifici possano favorire la scelta del filamento guida nel duplex miRNA/miRNA* e che entrambi i miRNA derivanti sono attivi (Seungil Ro et al., 2007). Le proteine della famiglia Ago sono anche la componente principale del complesso che induce il silenziamento genico RNA-mediato (RISC), attivando il meccanismo di repressione traduzionale di mRNA con regioni parzialmente complementari al miRNA incluso nel complesso.

Alcuni miRNA vanno incontro ad una biogenesi Droscha indipendente o Dicer indipendente. Del primo caso fanno parte pochi miRNA ed i mirtroni, processati dallo spliceosoma direttamente dal trascritto primario del gene ospite (Mark M.W. Chong et al., 2010; Ruby JG et al., 2007). Altri miRNA invece subiscono un processo di maturazione Dicer-indipendente e Ago2-dipendente; tale proteina infatti è l'unico membro delle proteine Argonauta ad avere un'attività endonucleolitica (Daniel Cifuentes et al., 2010; Sihem Cheloufi et al. 2010; Jr-Shiuan Yang et al 2012).

FUNZIONE CELLULARE E MECCANISMO D'AZIONE

I miRNA agiscono all'interno del complesso ribonucleoproteico RISC, indirizzando tale complesso verso l'mRNA bersaglio con cui mostra una parziale complementarietà di sequenza. L'impatto della regolazione genica mediata dai miRNA è forte se si considera che più del 60% dei geni di tutto il genoma possono subire tale regolazione (Anthony K. et al., 2013). Poiché è sufficiente un appaiamento imperfetto miRNA/mRNA per attivare il complesso RISC, uno stesso miRNA può avere come bersaglio differenti mRNA e viceversa differenti miRNA possono avere come bersaglio lo stesso mRNA. Inoltre il ruolo biologico dei miRNA è associato al ruolo dei loro mRNA target. Tali osservazioni ben rendono l'idea del potenziale regolativo dei miRNA nell'omeostasi cellulare, e più precisamente nelle diverse vie del segnale che includono regolazione della proliferazione cellulare, apoptosi, differenziamento, regolazione del ciclo cellulare, ematopoiesi e molti altri processi cellulari (Edenir Inês Palmero et al., 2011). Negli ultimi anni sta quindi diventando sempre più rilevante l'importanza dei microRNA nel controllo dello sviluppo, della fisiologia e della patologia animale.

Nei mammiferi l'appaiamento miRNA/mRNA è imperfetto e la specificità di riconoscimento è conferita dalla sequenza del miRNA detta "seed sequence" all'estremità 5' (nucleotidi in posizione 2-8). La regione dell'mRNA bersaglio responsabile dell'appaiamento è situata generalmente nella sequenza 3'UTR, ma esistono casi che coinvolgono anche il 5'UTR e le sequenze codificanti (Lytle JR et al., 2007).

Il silenziamento post-trascrizionale del bersaglio è eseguito grazie alle capacità enzimatiche del complesso RISC attivato dall'appaiamento miRNA/mRNA. I componenti proteici meglio caratterizzati del complesso RISC sono i membri della famiglia Ago e la glycine-tryptophan repeat-containing protein of 182 kDa (GW182). I meccanismi attivati

degradano e/o bloccano la traduzione dell'mRNA bersaglio in base al tipo di proteina Ago e all'appaiamento che si presenta. La **figura 2** mostra i principali meccanismi studiati di silenziamento miRNA-mediato: l'inibizione della traduzione può avvenire in corso d'opera, con il distacco prematuro dei ribosomi durante la fase di allungamento; la proteina nascente è degradata come conseguenza di un blocco della traduzione; il dominio centrale di Ago ha elevata analogia con il fattore di inizio della traduzione EIF4E, e quindi lo sostituisce nel legame al cappuccio di 7-metilguanosina; Ago recluta un fattore eIF6 che impedisce alle subunità del ribosoma di legarsi; RISC recluta enzimi per la deadenilazione impedendo quindi la formazione di un loop chiuso dell'mRNA che provocherebbe un aumento della traduzione; la deadenilazione e la successiva rimozione del capping provocano una veloce degradazione dell'mRNA bersaglio (Lewin et al., 2010, Ana Eulalio et al., 2008).

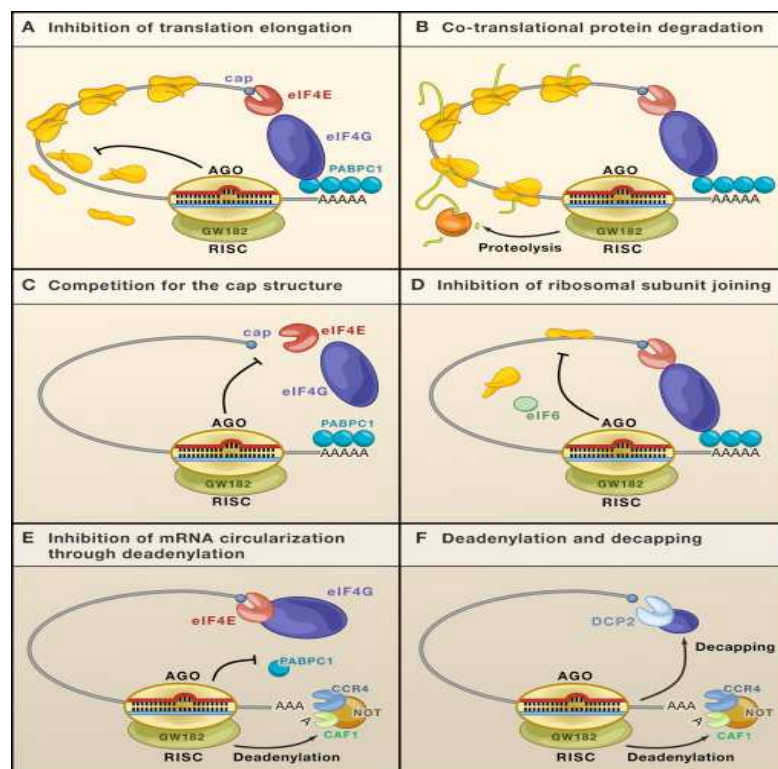


Figura 2. Meccanismi di silenziamento genico post-trascrizionale miRNA-mediati negli animali (Ana Eulalio et al., 2008).

Un arricchimento delle proteine Ago, di GW182, degli enzimi deputati alla deadenilazione, al decapping e alla degradazione dell'mRNA è trovato in vescicole citoplasmatiche dette P bodies o GW bodies (Jacek Krol et al., 2010; Marc Robert Fabian et al., 2010; Stoecklin G, and Kedersha N, 2013). Si ritiene che tali vescicole siano la sede di deposito e catabolismo degli RNA, poiché la loro presenza nella cellula aumenta e diminuisce insieme all'espressione dei due maggiori componenti di RISC, Ago e GW182 (Johnston et al., 2010).

Evidenze sperimentali mostrano come il ruolo nella regolazione dell'espressione genica dei miRNA non è confinata solo ad un meccanismo negativo, bensì anche a meccanismi positivi. Alcuni miRNA sono stati scoperti indurre attivazione della traduzione mediante gli stessi meccanismi di riconoscimento precedentemente menzionati (Vasudevan et al, 2007), o mediante interazioni miRNA/mRNA non canoniche (Henke et al, 2008; Orom et al, 2008). Altri ancora indicano come alcuni miRNA, seppure processati nel citoplasma da Dicer, sono in grado di traslocare nel nucleo ed attivare la trascrizione di specifici geni i cui promotori hanno sequenze dall'80 al 100% complementari al miRNA (Vera Huang and Long-Cheng Li, 2012).

REGOLAZIONE DELLA FUNZIONE DEI MIRNA

La funzione di ogni miRNA mediata dal complesso RISC è influenzata, oltre che dai livelli di espressione e dalla sequenza del miRNA stesso, dalla regolazione operata dai diversi componenti del complesso RISC. Il cuore del complesso è costituito dalla proteina Ago, di cui esistono 4 membri nei vertebrati. Sebbene non sembra che esista una specificità nel riconoscimento fra miRNA e proteina Ago (Asuka Azuma-Mukai et al., 2008), nella cellula l'abbondanza di una proteina rispetto ad un'altra influenza la potenza del

silenziamento genico indotto dal miRNA (Wu, L et al., 2008). Inoltre le proteine Ago sono regolate mediante diverse modificazioni post-trascrizionali, quali la fosforilazione, la prolil-idrossilazione, la poli ADP ribosilazione e ubiquitinizzazione (Jacek Krol et al., 2010). Un esempio è la fosforilazione della proteina Ago2 in seguito a stress cellulare e attivazione della cascata delle MAP chinasi, che provoca un accumulo della proteina nelle vescicole P (Zeng, Y., Zeng, Y. Et al, 2008). Sono state identificate decine di altre proteine implicate nella regolazione positiva e negativa della funzionalità dei miRNA (Jacek Krol et al., 2010). Inoltre dati di sequenziamento indicano l'esistenza per ogni miRNA di analoghe sequenze che differiscono solo per poche basi. Questi miRNA sono detti isomiR e possono derivare sia da mutazioni nel gene dei miRNA, sia dall'eterogeneità di taglio da parte di Dicer e Drosha, sia da meccanismi post-trascrizionali. In ogni caso l'esistenza degli isomiR allarga lo spettro regolativo associato ad ogni miRNA, in quanto può favorire il riconoscimento di target diversi (Llorens F et al., 2013).

REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEI MIRNA

La strategia più ovvia per regolare il silenziamento genico indotto dai miRNA è la modulazione dell'espressione dei miRNA stessi. L'utilizzo di microarray, tecniche di sequenziamento e di real time PCR ha permesso di studiare i profili di espressione di diversi miRNA. Ad oggi è noto che l'espressione dei microRNA è regolata durante lo sviluppo e per circa il 50% dei miRNA è tessuto specifica (Landgraf P. et al., 2007; Brandi and Akiko, 2009). Inoltre numerosi studi ne hanno dimostrato il coinvolgimento in diverse patologie, come quelle cardiovascolari, neurologiche, metaboliche, ma soprattutto oncologiche. Nel cancro i miRNA mostrano profili di espressione specifici per tipologia di

tumore (Sempere LF et al., 2004; Lu J et al., 2005; Lee EJ et al., 2008). Krol et al. (2010) hanno mostrato come il turnover dei miRNA è finemente regolato dagli eventi cellulari: nella retina ai cicli luce/buio è associata una veloce risposta di cambiamento dell'espressione dei miR-204, miR-211, miR-183, miR-96 e miR-182 mediante meccanismi trascrizionali e di metabolismo. Nonostante tali evidenze suggeriscano l'importanza della comprensione dei meccanismi di regolazione dell'espressione dei miRNA, questo argomento di ricerca è ancora poco conosciuto poiché non si conoscono i promotori della maggior parte dei miRNA. Un utile strumento di predizione per l'identificazione dei promotori dei geni è l'utilizzo di una banca dati genomica, come quella proposta dal browser UCSC (<http://genome.ucsc.edu>), in cui è possibile visualizzare la posizione dei geni, le modificazioni epigenetiche ed il legame di fattori coinvolti nella regolazione genica.

La regolazione dell'espressione dei miRNA occorre a livello trascrizionale e post-trascrizionale, di cui è proposto uno schema semplificato nella **figura 3**.

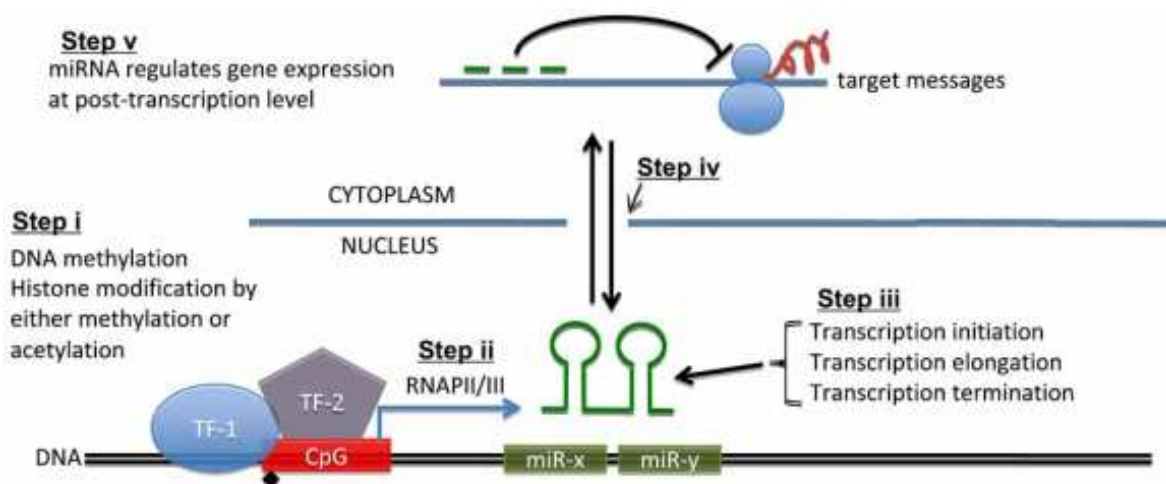


Figura 3. L'espressione dei miRNA è regolata a livello trascrizionale e post-trascrizionale. Step i: regolazione della trascrizione a livello epigenetico e mediante fattori di trascrizione (TF); Step ii: la trascrizione è RNA PolIII o PolIII dipendente; Step iii: diversi fattori possono regolare l'attività delle RNA Pol in diverse fasi della trascrizione; Step iv: regolazione della maturazione a pre-miRNA con successiva esportazione nel citoplasma; Step v: regolazione della maturazione a miRNA (Ruqiang Liang et al., 2009)

REGOLAZIONE TRASCRIZIONALE DELL'ESPRESSIONE DEI MIRNA

Come per i geni codificanti proteine, la trascrizione dei geni dei miRNA codificati dalla RNA PolIII dipende dall'attivazione del promotore. Anche le caratteristiche delle sequenze promotrici sono simili: circa l'85% dei promotori dei miRNA comprendono isole CpG (regioni ad elevata densità del dinucleotide CG), il 19% contiene TATA box, il 21% contiene elementi di riconoscimento TFIIB (BRE), il 47% contiene un Initiator (Inr), il 10% contiene elementi motif 10 (MTE) e l'87% contiene un elemento promoter a valle (DPE) (Fatih Ozsolak et al. 2008). Queste osservazioni indicano che i promotori dei miRNA sono controllati da fattori di trascrizione (TF), enhancer, silencing element e modificazioni epigenetiche.

Le modificazioni epigenetiche comprendono la metilazione delle isole CpG (aggiunta di un gruppo metile sul C-5 della citosina vicina ad una guanina) e le modificazioni istoniche. Kunej et al. (2011) indicano in uno studio integrativo di diversi lavori, in cui si associa l'espressione dei miRNA ad eventi epigenetici, che i miRNA sono più soggetti a regolazione epigenetica rispetto ai geni codificanti proteine.

La metilazione del DNA è generalmente associata con repressione dell'espressione genica, per cui le DNA metiltransferasi (DNMT) agiscono da repressori trascrizionali. Un esempio è riportato dai miR-148a, miR-34b/c, miR-9 e let-7 la cui trascrizione dipende dallo stato di metilazione del loro promotore che è regolato dalle DNMT1 e DNMT3b nel cancro al colon (Han et al., 2007). Altre alterazioni epigenetiche riguardano le modificazioni post-trascrizionali che avvengono sulla coda N-terminale degli istoni, quali fosforilazione, metilazione, acetilazione, ubiquitinizzazione, sumoilazione, deaminazione e ribosilazione (Kouzarides T., 2007). Queste proteine istoniche avvolte da circa 150-200 paia di basi di DNA costituiscono i nucleosomi. L'accessibilità del DNA alla trascrizione è regolata dall'interazione DNA-istoni, e quindi dalle modificazioni istoniche citate. La metilazione e

l'acetilazione sono le due modificazioni istoniche più studiate. Nel 2007 diversi studi hanno definito le caratteristiche epigenetiche tipiche dei promotori in cellule umane mediante tecniche eseguite sull'intero genoma (Guenther et al. 2007; Heintzman et al. 2007; Oszolak et al. 2007). Tra le modificazioni istoniche che delineano la presenza di promotori trascrizionalmente attivi sono la trimetilazione della lisina 4 dell'istone H3 (H3K4me3) e l'acetilazione delle lisine 9/14 dell'istone H3 (H3K9/14Ac), mentre promotori inattivi sono caratterizzati da una trimetilazione delle lisine 9/27 dell'istone H3 (H3K9/27me3) (Bannister AJ e Kouzarides T. , 2011). Anche la deplezione dei nucleosomi, caratterizzata da una più marcata accessibilità all'enzima DNAsi, nella regione di 100-130 bp vicina al sito di inizio della trascrizione (TSS) è una caratteristica dei geni trascrizionalmente attivi (Fatih Oszolak et al., 2008).

I fattori di trascrizione (TF) regolano l'espressione genica positivamente o negativamente, in modo specifico nei tessuti e durante lo sviluppo. Analisi bioinformatiche indicano che i miRNA hanno una generale propensione a regolare i fattori di trascrizione e che è possibile che esistano delle reti di regolazione tra miRNA e TF che conducono alla regolazione del miRNA stesso (Shalgi R et al., 2007). Un esempio di autoregolazione dell'espressione dei miRNA è dato durante la megacariocitopoiesi dal fattore Runx1 che induce l'espressione del miRNA-27a che a sua volta inibisce la traduzione del medesimo fattore (Ben-Ami O et al., 2009). Come mostrato nella **figura 4.**, oltre a questo meccanismo di regolazione a feedback negativo unilaterale, ne esistono altri esempi a feedback negativo reciproco o meccanismi indiretti (Brandi N Davis e Akiko Hata, 2009; Jacek Krol et al., 2010).

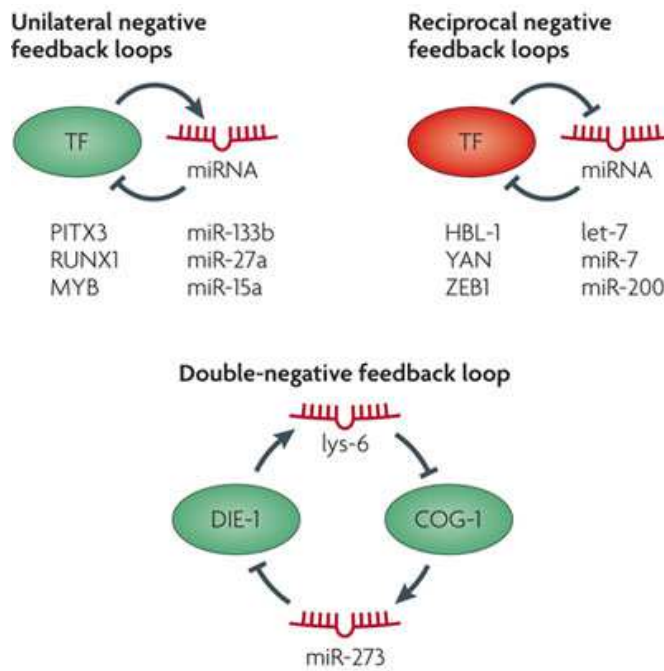


Figura 4. Circuiti regolatori dell'espressione dei miRNA (Jacek Krol et al., 2010).

REGOLAZIONE POST-TRASCRIZIONALE DELL'ESPRESSIONE DEI MIRNA

Il controllo dei meccanismi di biogenesi e catabolismo dei miRNA è un ulteriore meccanismo che ne definisce il pattern di espressione. Sono stati identificati diversi fattori che regolano l'espressione di specifici miRNA durante la biogenesi, interagendo con Drosha e Dicer. Si possono quindi distinguere meccanismi correlati alla modulazione dell'attività di Drosha e di Dicer, e quelli che fanno parte dei processi di catabolismo dei miRNA. L'induzione dell'attività RNAsica III dei 2 enzimi necessita della cooperazione di altri fattori che sono specifici di pochi miRNA o universali per tutti i miRNA, tra cui le proteine dsRBP, rispettivamente DGCR8 e TRBP. I livelli cellulari delle proteine Drosha e DGCR8 sono regolati finemente e reciprocamente, infatti un eccesso del quantitativo della dsRBP di 3 volte rispetto a quelli della RNAsi III provoca inibizione della stessa (Omer Barad et al., 2012). Sebbene DGCR8 interagisce in modo diretto e stabilizza l'attività

enzimatica di Drosha (Faller et al, 2007), i suoi livelli di mRNA sono regolati dalla stessa attività enzimatica dell' RNasi III, che riconosce la struttura a forcina presente nel suo mRNA e la digerisce (Han, J. et al., 2009). Anche TRBP interagisce e stabilizza Dicer. Una bassa espressione di TRBP destabilizza l'attività enzimatica di Dicer, mentre una fosforilazione ne stimola sia l'attività che l'espressione (Paroo et al, 2009). Il meccanismo è a feedback indiretto e coinvolge una sotto-espressione di let-7 che regola l'espressione di Dicer mediante lo stesso complesso RISC (Forman et al., 2008).

Altri meccanismi di regolazione post-trascrizionale sono specifici di pochi miRNA e coinvolgono proteine capaci di riconoscere e legare in modo diretto i precursori dei miRNA di cui regolano l'espressione. Tra queste, la famiglia di ribonucleoproteine nucleari eterogenee (hnRNP) comprende 19 membri, tutti con distinti siti di legame all'RNA e con espressione tessuto-specifica. Diversi membri legano specifici pri-miRNA a livello dell'ansa che è altamente conservata nell'evoluzione (Shimada N et al., 2009; Allemand E et al. 2008; Carpenter B et al., 2006), come ad esempio l'hnRNP I e l'hnRNPA1 legano l'ansa del pri-miR-101-1 facilitandone la processazione da Drosha (Michlewski et al.,2008).

Un meccanismo di catabolismo dei miRNA prevede che l'adenosina deaminasi che agisce sugli RNA (ADAR) catalizzi la conversione di un residuo di adenosina in inosina in un segmento a doppio filamento di RNA, come nelle forme precorritrici dei miRNA. Questo processo è definito "miRNA editing" e causa effetti diversi sull'emivita dei miRNA. Può provocare blocco o attivazione dei processi di maturazione RNasi III- dipendenti oppure può favorire il riconoscimento del precursore da parte della nucleasi Tudor-SN che ne provoca una degradazione (Scadden, A. D., 2005). Se la reazione avviene su residui all'interno della seed sequence, non influenza il turnover dei miRNA bensì ne può modificare ed ampliare lo spettro di mRNA riconosciuti (Kawahara, Y. et al., 2007).

MICRORNA E TUMORI

Fino alla comparsa dei miRNA si riteneva che una deregolazione di oncogeni e oncosoppressori fosse alla base della tumorigenesi e sviluppo dei tumori, le cui cellule sono caratterizzate da modificazioni del fenotipo normale. Queste sono spesso causate da alterazioni genetiche, quali mutazioni puntiformi (SNP), inserzioni/delezioni, e riarrangiamenti cromosomici, che causano un' overespressione di proteine ad attività oncogenica o una sottoespressione di quelle ad attività di oncosoppressore. Altri eventi che causano tali deregolazioni sono le modificazioni epigenetiche, tra cui la più studiata nell'ambito dei tumori è la metilazione del DNA. Una nuova frontiera alla comprensione dei meccanismi tumorigenici è stata offerta dalla scoperta dei miRNA. Ad oggi si ritiene che alcuni miRNA possano avere un ruolo primario nello sviluppo della patologia. Questi sono chiamati **oncomiR** e nei tumori possono agire da oncosoppressori, sotto-espressi perciò incapaci di regolare l'espressione di proteine oncogeniche, oppure da oncogeni, sovra-espressi con funzione di regolazione di proteine ad attività di oncosoppressore (**Figura 5**) (Edenir Inês Palmero et al., 2011).

Due evidenze pongono in correlazione tumorigenesi e miRNA. La prima è che molti miRNA sono coinvolti nella regolazione della proliferazione cellulare e dell'apoptosi. I miRNA della famiglia let-7 sono stati tra i primi oncomiR identificati. Più precisamente essi agiscono da oncosoppressori poiché attivano il complesso RISC su diversi mRNA di oncogeni, di cui un esempio è il gene RAS la cui continua attivazione stimola crescita e proliferazione cellulare (Johnson et al., 2005). La seconda è stata l'osservazione che il 50% dei miRNA sono deregolati nel cancro ed hanno loci genici in prossimità di siti fragili del genoma umano, correlati all'instabilità del DNA nelle cellule cancerose (Calin et al., 2004a; Calin et al., 2004b).

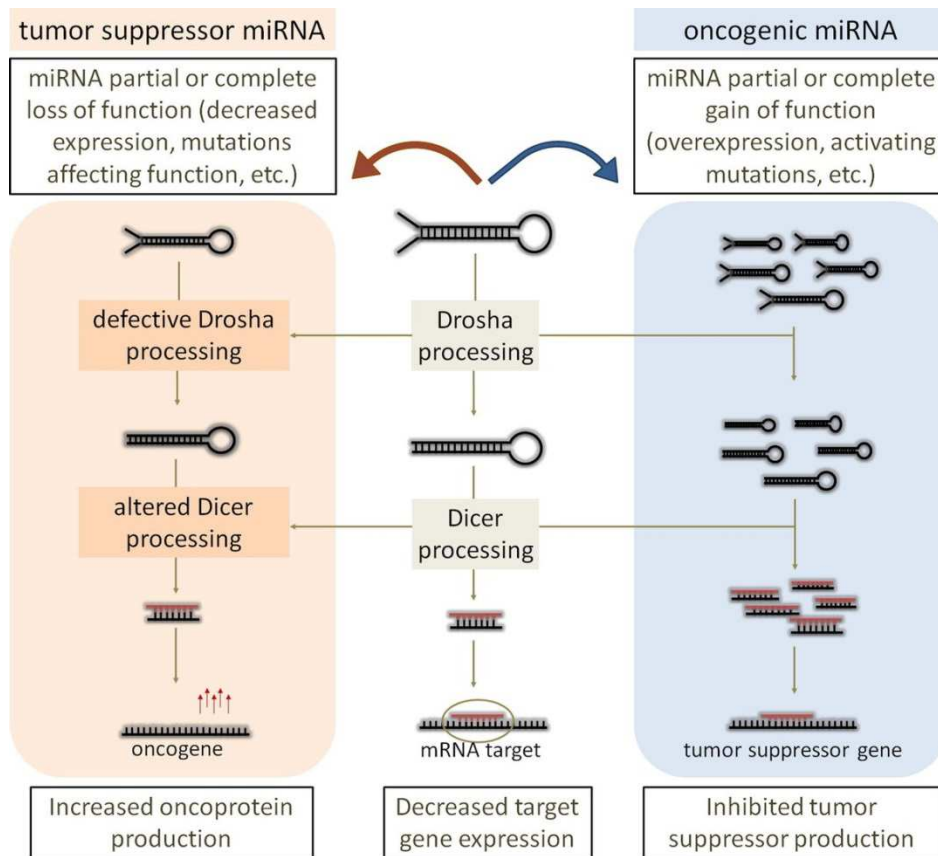


Figura 5. La modulazione dell'espressione degli oncoMir promuove la tumorigenesi. (Kunej Tanja et al., 2012)

Il profilo di espressione dei miRNA è stato indicato come strumento migliore per elaborare diagnosi, prognosi, e trattamento clinico nei pazienti affetti da tumore, rispetto alla rilevazione di marcatori proteici (Lu J et al., 2005). Alcuni miRNA infatti sono specificamente più espressi solo in un tipo di tumore, riuscendone a caratterizzare anche la malignità (Gianpiero Di Leva e Carlo M Croce, 2013; Strillacci et al., 2012).

Altri miRNA mostrano una deregolazione comune nella stessa famiglia di tumori come quella dei tumori solidi (Volinia S et al., 2006). Studi di espressione possono anche correlare la deregolazione dell'espressione dei miRNA con eventi implicati nella tumorigenesi. Kulshreshtha et al. hanno comparato i miRNA con aumentata espressione in seguito a trattamento ipossico con i miRNA associati alla presenza di tumori solidi, ed

hanno trovato simili regolazioni. Poiché l'ipossia è un noto fattore ambientale pro-tumorale tale correlazione è significativa nella comprensione del ruolo oncogenico dei miRNA implicati (Kulshreshtha et al., 2007; Shen G et al., 2013). Un'altra motivazione della scelta dei miRNA come biomarcatori tumorali è da ricercarsi nella non invasività dell'analisi. Infatti i miRNA sono presenti anche in diversi fluidi cellulari di facile reperibilità, quali siero, plasma, saliva e urine (Cortez MA et al., 2011). Diversi studi hanno dimostrato che in questi compartimenti l'espressione dei miRNA correla con specifici tumori, come gli elevati livelli del mir-92 nel tumore colon-rettale (Chen X et al., 2008; Ng EK et al., 2009).

CARCINOMA DEL COLON-RETTO

Il carcinoma colon-rettale (CRC) è il terzo più frequente tumore diagnosticato nei maschi e secondo nelle femmine. Nel 2012 la società scientifica "American Society of Colon & Rectal Surgeons" indica che questa neoplasia si manifesta in forme sporadiche per il 50-60% dei casi, in forma familiari per il 30-40% dei casi e in forme ereditarie per il 4-6% dei casi. Si conoscono diverse sindromi ereditarie, poliposiche e non. Le forme poliposiche comprendono ad esempio la sindrome poliposica adenomatosa familiare (FAP), mentre tra le forme non poliposiche troviamo la sindrome di Lynch, una malattia autosomica dominante che si manifesta alquanto precocemente e con una frequenza assai maggiore rispetto alle forme poliposiche. Casi in cui il tumore compare "sporadicamente" rappresentano la stragrande maggioranza di CRC e si manifestano in persone che non presentano fattori di rischio ereditari, anche se i meccanismi genetici coinvolti si sovrappongono parzialmente a quelli delle forme ereditarie. Le cause genetiche alla base della carcinogenesi sono raggruppate in instabilità cromosomica (nell'80% dei CRC la segregazione anormale dei cromosomi e del contenuto di DNA provoca mutazioni attivanti

di oncogeni e/o mutazioni disattivanti di geni oncosoppressori), instabilità microsatellitare (il 15% dei CRC è provocata da mutazioni inattivanti dei geni del mismatch repair MMR che sono deputati alla correzione di mutazioni introdotte durante la duplicazione di regioni genomiche contenenti ripetizioni di sequenze, dette microsatelliti) ed eventi epigenetici (nel 30% di CRC si osserva una ipermetilazione del genoma) (Dan A. Dixon et al., 2013).

Il modello della carcinogenesi ad oggi accettato, seppur con nuovi dettagli proposti dalla ricerca sugli eventi epigenetici e sui miRNA, è quello sequenziale proposto da Fearon e Vogelstein nel 1990: lo sviluppo del CRC è il risultato di accumulazioni di “alterazioni” molecolari, siano esse genetiche ed epigenetiche, che si manifestano clinicamente a livello morfologico nella progressione temporale da adenoma a carcinoma (Fearon ER e Vogelstein B., 1990; Ajay Goel e C. Richard Boland, 2012) (**Figura 6**). L’adenoma tubulare rappresenta il più precoce precursore del processo neoplastico. La crescita continua di tale adenoma porta al coinvolgimento della componente villosa, realizzando in tal modo un adenoma avanzato o polipo con atipia citologica e strutturale. Gli eventi molecolari più frequenti in tale fase sono le mutazioni inattivanti del gene APC (il nome Adenomatous Polyposis Coli deriva dal fatto che è la mutazione presente nei pazienti affetti da FAP) e mutazioni attivanti del gene KRAS (è il componente centrale del sistema di trasduzione del segnale a valle dell’EGFR). Una perdita della funzione di APC provoca un’attivazione costitutiva della via del segnale Wntless (WNT) e quindi della β -catenina, che come KRAS, agisce stimolando la crescita e proliferazione cellulare. L’accumulo di queste mutazioni nella cellula della mucosa intestinale provoca una selezione clonale, favorita dall’accelerata proliferazione rispetto alle altre cellule non trasformate.

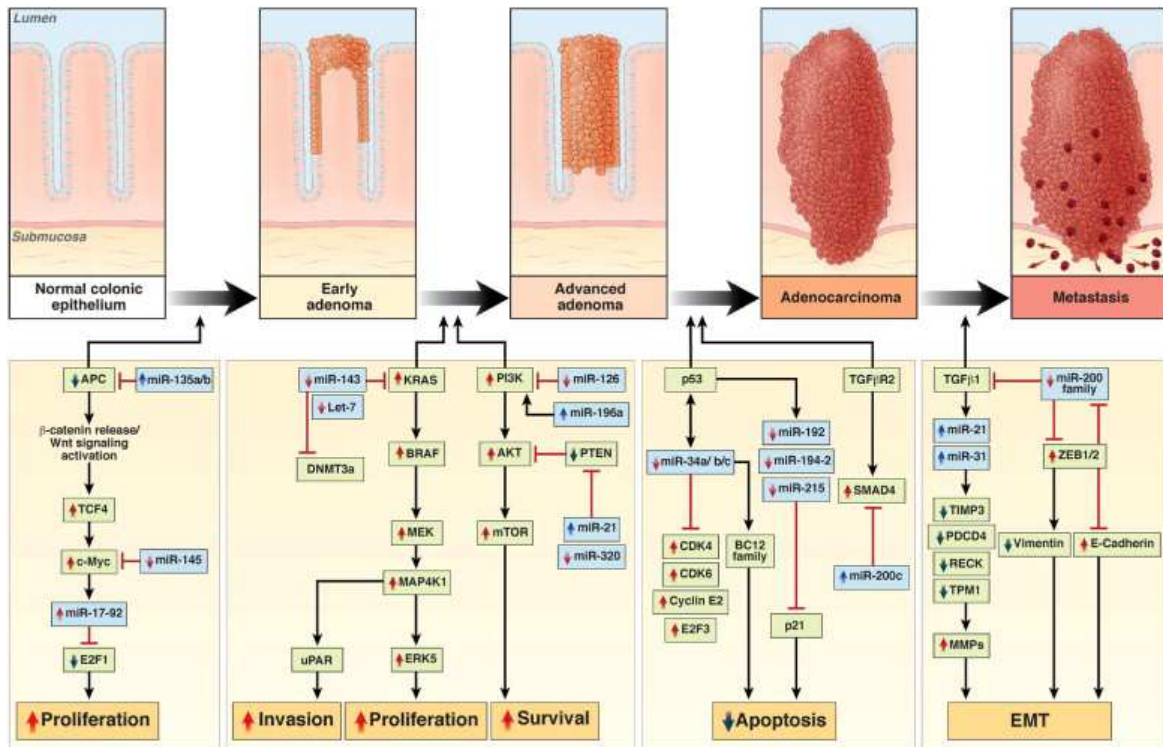


Figura 6. Modello multistep della carcinogenesi colon-rettale. La figura pone in correlazione temporale i geni target più frequentemente soggetti a mutazione (in verde) con le caratteristiche cliniche (sopra) e cellulari (sotto). Inoltre sono mostrati alcuni miRNA la cui espressione è deregolata in CRC (in blue) (Ajay e Boland, 2012).

Altre mutazioni sequenziali che inibiscono l'apoptosi, come quelle riguardanti l'oncosoppressore p53 e la via del segnale del fattore di crescita TGF β , rappresentano generalmente eventi pi \grave{u} tardivi. Nella cellula tali meccanismi attivati durante la tumorigenesi, WNT, TGF β e Ras, stimolano l'espressione dei fattori di trascrizione SNAI 1/2, Twist e ZEB 1/2 che regolano la transizione dal fenotipo epiteliale a mesenchimale (EMT). Le cellule perdono le caratteristiche epiteliali come adesione cellulare, polarit \grave{a} apico-basale, espressione di E-caderina e citocheratine, ed acquista quelle mesenchimali come aumentata mobilit \grave{a} cellulare, attivazione delle metalloproteinasi di matrice, sovraespressione di N-caderina, vimentina e fibronectina. Tali caratteristiche rendono le cellule capaci di invadere e metastatizzare altri organi.

Anche il microambiente in cui crescono le cellule cancerose influenza positivamente la crescita del tumore. Si ritiene che l'infiammazione cronica sia il microambiente che

maggiormente contribuisce all'iniziazione del CRC sporadico poiché stimola la produzione di citochine pro-infiammatorie, agenti ossidanti ed enzimi litici. In particolare l'enzima ciclossigenasi 2 (COX2) aumenta la sua espressione in tali condizioni e produce elevate quantità della prostaglandina PGE2 che a sua volta gioca un ruolo centrale nella tumorigenesi intestinale (attivazione della via del segnale NF- κ B e aumento della proteina anti-apoptotica Bcl-2) stimolando proliferazione cellulare, migrazione cellulare ed angiogenesi. Ma l'infiammazione può essere anche un evento che influenza solo la progressione, infatti il fattore di trascrizione β -catenina, attivato in FAP con APC mutato, aumenta l'espressione di COX-2. Modelli cellulari ed animali con APC mutata ed inattiva, mostrano una riduzione della crescita tumorale in seguito a delezione del gene COX-2. Inoltre studi clinici dimostrano che l'utilizzo di farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) che inibiscono in modo selettivo o non selettivo la COX-2, tra cui l'aspirina, costituiscono una buona terapia di prevenzione allo sviluppo del tumore colon-rettale. (Ahnen, 2011). L'ipossia è un'altra caratteristica del microambiente in cui si sviluppano i tumori solidi. Uno stato di ipossia (e/o anossia) è il risultato dello squilibrio tra l'eccessiva crescita cellulare con elevato consumo di O₂ e la mancanza di un efficace irrorazione sanguigna nella zona centrale della massa tumorale. A livello molecolare, lo stress ipossico causa delle risposte adattative della cellula che portano all'attivazione del fattore di trascrizione HIF-1 α , che conferisce un vantaggio proliferativo e nello sviluppo di un fenotipo maggiormente maligno.

Nuovi dettagli a questa sequenza di eventi cancerogenetici vengono dalla ricerca sull'epigenetica e sui miRNA. Le prime evidenze di una deregolazione dei processi di metilazione del DNA associati al CRC risalgono al 1985 (Goelz SE et al., 1985; Feinberg et al., 1988). Ad oggi diversi lavori riportano un silenziamento dell'espressione metilazione-mediato di oncosoppressori come i fattori PTEN e APC, entrambi coinvolti

nelle prime fasi della tumorigenesi del CRC sporadico (Worthley DL et al, 2010). La metilazione del promotore del gene MLH1 e MGMT, coinvolti nei meccanismi di riparo al danno al DNA, favorisce l'accumulo di altre mutazioni per la progressione del CRC. Si ritiene che "epimutazioni" come quelle indicate possano rappresentare sia eventi precoci nello sviluppo tumorale sia eventi tardivi (Ogino S et al., 2006). È stato dimostrato infatti che l'ipermetilazione di MLH1 in alcuni pazienti è un evento ereditato da madre in figlio e che rappresenta il primo evento molecolare in grado di favorire la selezione clonale di un fenotipo cellulare maligno (Hitchins MP et al., 2007).

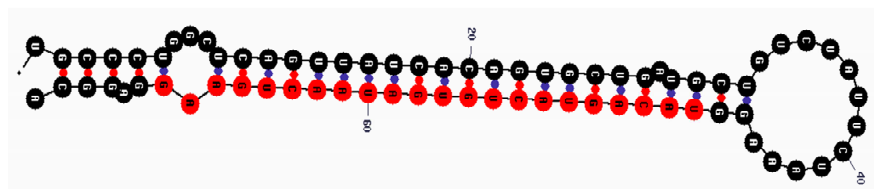
Dai numerosi lavori sui miRNA se ne evince il potenziale regolativo su tutte le maggiori vie del segnale implicate nello sviluppo del CRC. Brevemente queste includono un impatto sul segnale WNT/ β -catenina (miR-135a/b, miR-139, miR-145, miR-17-92), sulla proliferazione cellulare (let-7 family, miR-18a, miR-21, miR-126, miR-143, miR-200c), sull'apoptosi (miR-34a, miR-133b, miR-195), sul ciclo cellulare (miR-34a, miR-192, miR-215, miR-675), sul segnale p53 (miR-34b/c), sulla differenziazione cellulare (miR-141, miR-200c), sulla migrazione e invasione cellulare (miR-126, miR-143, miR-196a, miR-200a/b/c, miR-373, miR-520c) (Ajay e Boland, 2012).

HSA-MIR-101

Nel 2002 Mourelatos Z et al. in un esperimento di immunoprecipitazione del complesso identificato come 15S RNP, di cui i componenti sono una proteina Ago e diverse RNA elicasi, isolano e sequenziano per la prima volta l'hsa-miR-101 (miR-101). Il miRNA-101 ha due loci: un locus è sul filamento negativo del cromosoma 1p31 che è intergenico (miR-101-1), e un secondo locus è sul filamento positivo del cromosoma 9p24 all'interno di un introne del gene RCL-1 (miRNA-101-2). Da ogni gene origina un trascritto primario non

caratterizzato e quindi un precursore. I due pre-miR-101-1 e pre-miR-101-2 (**Figura 7**) formano delle strutture a forcina di 75 e 79 paia di basi rispettivamente, che vengono processate nell'unico miR-101 maturo.

(a)



(b)

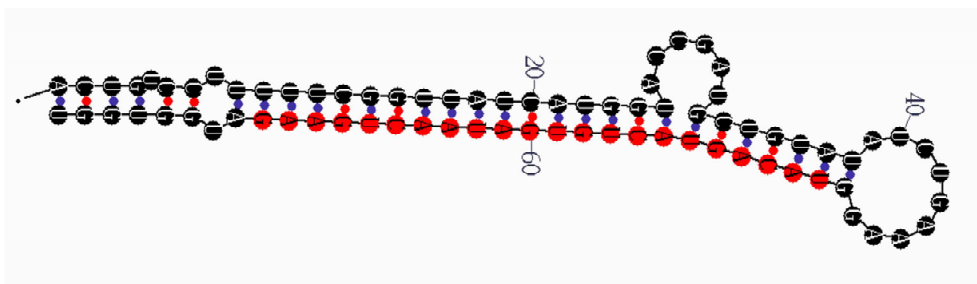


Figura 7. Struttura a forcina dei due precursori pre-miR-101-1 (a) e pre-miR-101-2 (b)

In 20 anni lo studio del ruolo del miRNA negli eventi cellulari ha portato all'identificazione della sua attività antitumorale, agendo su diverse vie del segnale. La prima evidenza che questo miR potesse agire da oncosoppressore risale al 2008, in un articolo in cui è dimostrato che la perdita dei locus genici del miR-101 si osserva nel 67% dei tumori alla prostata e che la bassa o mancata espressione del miR è inversamente proporzionale ai livelli di espressione dell'oncogene EZH2, target del miR stesso (Varambally S et al., 2008). Nel nostro laboratorio invece il miR-101 è stato identificato come potente oncosoppressore nel CRC, inibitore della traduzione dell'mRNA della COX-2, la cui espressione è ridotta in linee cellulari tumorali di CRC e nei tessuti tumorali di colon (Strillacci A et al., 2009; Strillacci A et al., 2012). È quindi duplice l'evidenza che il

miR-101 abbia funzione da oncosoppressore: la ridotta espressione in vari tipi di tumore, quali cancro colon-rettale, gastrico, tiroideo, polmonare, epatico, pancreatico, al seno e prostatico, e l'inibizione traduzionale svolta su diversi oncogeni. La **Tabella 1** mostra i target diretti del miR-101, coinvolti in diverse vie del segnale ed eventi cellulari. Il coinvolgimento più evidente è nell'infiammazione e nel mantenimento del fenotipo epiteliale. In riguardo all'infiammazione, i diversi articoli sembrano proporre delle attività contrastanti. L'IL-1 β è una nota citochina pro-infiammatoria e la sua espressione sembra regolare positivamente l'espressione del miR, al contrario una delezione della citochina anti-infiammatoria IL-10 ne provoca una sovraespressione. Si deduce quindi un ruolo pro-infiammatorio del miR-101 che contrasta con l'effetto inibitorio del miR su importanti mediatori infiammatori come la COX-2 e EP4, recettore della PGE2. Una possibile spiegazione potrebbe trovarsi in un'espressione cellula o tessuto specifica, oppure cancro-specifica. Il miR-101, infatti, regola anche altri fattori coinvolti in vie del segnale che incrociano quella infiammatoria, quali la risposta immunitaria, di cui la forma innata è regolata tramite il silenziamento di MKP-1. Altre vie del segnale spente dall'espressione del miR-101 sono quelle implicate nell'EMT, in cui fondamentale è il ruolo delle modificazioni epigenetiche mediate da DNA metil transferasi, di cui il miR regola DNMT3A, e da proteine del gruppo Polycomb che inducono il silenziamento di oncosoppressori metilando nel loro promotore l'istone H3 (H3K27me2/3), di cui il miR regola EZH2. Un'altra evidenza del ruolo del miR nel mantenimento del fenotipo epiteliale è dato dal lavoro di Friedman et al. (2009). Gli autori individuano il pattern dei miRNA implicati nel mantenimento dello stato dedifferenziato e proliferativo caratteristico delle cellule staminali embrionali. In tali cellule l'espressione del miR-101 è repressa ed aumenta durante il differenziamento (Jeffrey M Friedman et al., 2009).

Tabella 1. Studio del ruolo cellulare del miR-101

<i>Vie del segnale</i>	<i>Fattore bersaglio</i>	<i>Contesto cellulare</i>	<i>Regolatori dell'espressione del miR-101</i>	<i>Riferimenti</i>
Epigenetica, EMT	EZH2 (indiretto E-caderina)	Carcinoma pancreatico, al polmone, renale, gastro-intestinale, gastrico		Qazi et al., 2012; Cho HM et al., 2011; Sakurai et al., 2012; Carvalho et al., 2012; Wang HJ et al. 2010
PKC α , ERK	EZH2	Epatocarcinoma	TPA(12-O-tetradecanoil forbolo 13 acetato), ERK, PKC α ?	Chao-Weai et al., 2010
Ipossia, ormoni androgeni	EZH2	Tumore alla prostata	HIF1 α /HIF1 β , recettore degli androgeni	Paul Cao et al., 2010
Infiammazione	COX-2	Cancro colonrettale, prostatico, gastrico		Strillacci et al., 2009; He XP et al., 2012; Hao Y et al., 2011; Wang HJ et al. 2010
Infiammazione, EMT, organizzazione della matrice extracellulare.	SOX-9	Condrociti, Epatocarcinoma	IL-1 β	Linghui et al., 2012; Zhang et al., 2012
Differenziamento, neurogenesi	Stathmin 1	Tumore al seno		Wang R. et al, 2012
Regolatore centrale del metabolismo cellulare, apoptosi e autofagia in risposta a fattori di crescita (es. EGF, FGF, insulina) e segnali di stress (es. ipossia e nutrienti)	mTOR	Cellule epiteliali (HUVEC); fibroblasti fetali.	Stress tensivo sviluppato dal flusso sanguigno sull'endotelio; Infezione da citomegalovirus.	Chenet al., 2012; Wang FZ et al., 2008.
TGF β , NGF, EGF, MAPK	cFOS	Fibroblasti cardiaci, cancro gastrico		Pan Z. et al., 2012; Wang HJ et al. 2010
Infiammazione	EP4	Cancro colonrettale		Chandramouli A. et al, 2012
Infiammazione, omeostasi ionica	CFTR	Epitelio bronchiale	Fumo di sigaretta, cadmio	Hassan F et al, 2012
Angiogenesi, immunità, coagulazione	Serpin B3	Cancro alle ovaie		Whasum Lim et al., 2012
MAPK, infiammazione, immunità	MKP1	Lupus eritematoso	Infiammazione?	Yang J et al, 2013
Epigenetica, EMT	DNMT3A	Epatocarcinoma	Infezione da virus dell'epatite B	Wei X et al., 2013
PTEN, p53, MAPK		Epatocarcinoma	Benzotiazolo	Pushpavallis et al., 2011
Infiammazione		Modello di tumore al colon in topi IL 10 ^{-/-}	Silenziamento IL-10?	Schaefer JS et al, 2011
Autoimmunità	ICOS	Cellule Th1, sindrome autoimmunitaria		Yu D et al., 2007
Differenziamento e apoptosi	Mcl1	Cancro al polmone, gastrico		Luo L et al., 2012; Wang HJ et al. 2010
Autofagia	STMN1,	Cancro al seno	Etoposide,	Frankel LB et al., 2011

	RAB5A, ATG4D		rapamicina, deprivazione di nutrienti	
Riparo al DNA	ATM, DNA- PK catalytic subunit	Cancro al polmone		Chen S et al., 2011
Neurodegenerazione, infiammazione	APP	neuroni	IL-1 β	Vilardo E et al., 2010; Long JM e Lahiri DK., 2011.

La **tabella 1** riporta anche i principi attivi, i mediatori cellulari e gli eventi ambientali riportati dagli articoli come regolatori dell'espressione del miR-101. Per nessuno di questi è stato individuato il meccanismo d'azione e da ciò deriva l'ulteriore difficoltà alla comprensione della funzione del miR-101 in eventi come l'infiammazione. In particolare l'espressione del miR-101 nei tumori può essere un risultato di mutazioni genetiche (Varambally S et al., 2008), di una disregolazione dei complessi implicati nella sua biogenesi, e di una regolazione mediata da fattori di trascrizione. Del secondo caso potrebbero far parte i malfunzionamenti dei fattori hnRNP I e hnRNPA1, che rappresentano gli unici componenti del complesso Drosha che sono stati studiati per il riconoscimento specifico dell'ansa di pochi pri-miRNA, tra cui il pri-miR-101-1 (Michlewski et al., 2008). L'incidenza di ciascuna di questi 3 eventi regolativi non può essere valutata finché non si identificano le sequenze dei trascritti primari del miR-101-1/2 e i relativi promotori.

SCOPO DEL LAVORO

I microRNA sono piccole molecole di RNA non codificante che influenzano diverse funzioni biologiche attraverso la repressione di geni bersaglio sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Il miR-101 è stato ben caratterizzato come miRNA oncosoppressore, la cui espressione è ridotta in molti tipi di tumore, tra cui il cancro colonrettale (CRC). I diversi target molecolari del miR-101 offrono al tumore le caratteristiche maligne quali dedifferenziamento, perdita di adesività, potenziale invasivo ed angiogenesi. L'espressione del miR-101 invece è tanto più bassa quanto maggiore è la malignità del tumore. In vitro numerosi esperimenti mostrano come un ripristino dell'espressione del miR-101 nel contesto dei tumori solidi, apporta una riduzione del fenotipo maligno e blocco della proliferazione cellulare. Il CRC rappresenta una delle principali cause di morte nei paesi occidentali e la prevenzione di questa patologia è limitata dalla mancanza di biomarcatori che permettono una diagnosi precoce e di chemioterapici efficaci. Il miR-101 è già stato proposto come biomarcatore del CRC ed il potenziale regolativo del miR-101 nella cancerogenesi potrebbe essere utilizzato a scopi terapeutici. Tuttavia la scarsa comprensione dei meccanismi di regolazione dell'espressione del miR-101 rappresentano un ostacolo allo sviluppo di nuove frontiere nel trattamento terapeutico. L'obiettivo di questa ricerca è stato quello di identificare i trascritti primari del miR-101 e gli elementi regolativi della loro espressione. In questo modo sarà possibile identificare i regolatori chiave dell'espressione del miR-101 che provocano la sua repressione nei tumori e i regolatori che potrebbero apportare una regolazione positiva nel trattamento del CRC.

MATERIALI E METODI

COLTURE CELLULARI

Le linee cellulari utilizzate si classificano in linee epiteliali di colon carcinoma (SW620 e HCA7, acquistate dall'American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA), linee primarie epiteliali (HUVEC) e linee epiteliali di colon normale (NCM460 ottenute con la licenza dell'Incell Corporation, San Antonio, TX, USA).

Le linee sono mantenute in coltura in terreno Dulbecco'S Modified Eagle's Medium supplementato di glutamax (DMEM-GlutaMAX™), a cui è stato aggiunto il 10% di siero fetale bovino (Gibco) scomplementato a 56°C per 30 minuti, e gli antibiotici penicillina (100 U/ml) e streptomina (100 mg/ml) (Sigma), a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ (Billups-Rothenberg Inc., USA).

ESTRAZIONE DELL'RNA TOTALE DA CELLULE

L'RNA totale è stato estratto dalle linee cellulari con il reagente Trizol (Società Italiana Chimici) seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Il pellet di RNA ottenuto, è stato risospeso in acqua priva di endonucleasi (trattata con di-ethyl-pyro-carbonate, DEPC), ed analizzato mediante lettura allo spettrofotometro (Nanodrop ND-1000, Celbio) che permette di valutarne la concentrazione mediante il picco di assorbanza nell'UV a 260 nm e la purezza attraverso delle letture di assorbanza 280 nm e 230 nm. La qualità dell'RNA totale è stata analizzata mediante elettroforesi orizzontale in gel di agarosio.

PREPARAZIONE DEL GEL DI AGAROSIO PER L'ANALISI DI ACIDI NUCLEICI

Per la separazione di acidi nucleici prodotti da reazioni di PCR o ottenuti da estrazioni cellulari è utilizzata l'elettroforesi orizzontale in gel di agarosio. La quantità di agarosio desiderata (concentrazione di agarosio nel gel variabile da 1% a 2,5%, tanto più alta quanto più grandi sono le dimensioni delle molecole da separare) viene disciolta, attraverso bollitura, in tampone 1X TBE (90 mM Tris-HCl pH 8.3; 90 mM acido borico; 2.5 mM EDTA), raffreddata a circa 50°C e versata nella vaschetta contenente il pettine per formare i pozzetti. Dopo la solidificazione il gel è inserito nella camera di corsa, ricoperto di tampone 1X TBE, il pettine viene rimosso ed i pozzetti vengono caricati con i campioni da analizzare, già addizionati con il loading dye 10X (50% glicerolo, 1mM EDTA pH 8, 0.2% blu di bromo fenolo in acqua DEPC). Infine viene applicato un voltaggio costante di circa 5 V/cm. Per la visualizzazione dei frammenti di DNA/RNA così separati si utilizza come intercalante di acidi nucleici il Gel Red (Socità Italiana Chimici), aggiunto al gel di agarosio prima della solidificazione oppure diluito nel buffer TBE in cui è immerso il gel per 5 minuti dopo la corsa elettroforetica. Tale intercalante permette di visualizzare con una buona risoluzione gli acidi nucleici in seguito ad esposizione a raggi UV utilizzando un transilluminatore (Universal Hood II, BioRad)

MARCATURA DI OLIGONUCLEOTIDI ALL'ESTREMITÀ 5'

Oligonucleotidi marcati radioattivamente all'estremità 5' sono stati utilizzati in saggi di primer extension e di northern blot. Per la reazione di marcatura, a 5 pmoli di oligonucleotide vengono aggiunti 1 µl di enzima T4 Polynucleotide Kinase (10 U/µl, Invitrogen), 3 µl di [γ -³²P]-ATP (10 µCi/µl), 2 µl 5X Forward Reaction Buffer e H₂O fino a

raggiungere un volume totale di reazione di 10 μ l. Il campione viene incubato a 37°C per 30 min. L'oligonucleotide marcato è purificato tramite cromatografia per esclusione dimensionale utilizzando una colonnina (Empty Bio-Spin Columns, Bio-Rad) impaccata con Sephadex G-50 coarse (Euroclone), seguendo le istruzioni del fornitore.

PRIMER EXTENSION

Per ciascuna reazione di primer extension, 20 μ g di RNA totale vengono precipitati per centrifugazione ed il pellet viene fatto asciugare all'aria per qualche minuto. Successivamente, l'RNA viene risospeso in 9 μ l di una soluzione contenente 1X RT Buffer (Kit Maxima Reverse Transcriptase, Fermentas), 8 mM dNTPs e 0,1 pmol di oligonucleotide marcato radioattivamente. Il campione viene riscaldato a 100°C per 2 minuti e quindi posto a 50°C per 5 min. Successivamente, sono aggiunte 100 U di enzima Reverse Transcriptase e il campione viene incubato a 50°C per 30 min. A reazione completa, si procede alla purificazione del prodotto di retrotrascrizione aggiungendo 10 μ g di RNasi A (Thermo Scientific) ed incubando a 37°C per 10 minuti. Il volume della reazione viene portato a 100 μ l con H₂O, per facilitare un'estrazione con 1 volume di fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (25:24:1), seguita da una precipitazione con 2,5 volumi di etanolo e 0.1 volumi di 3 M NaOAc pH 5.2. Il pellet di cDNA così ottenuto è risospeso in 10 μ l di Formamide Loading Buffer (95% formammide, 0,01% blu di bromofenolo, 20 μ M EDTA pH 8) e denaturato riscaldando a 100°C per 3 minuti. I campioni così preparati vengono caricati su gel di poliacrilammide denaturante.

I frammenti di cDNA marcati radioattivamente di lunghezza compresa tra 20 e 500 basi sono stati analizzati tramite corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide al 6% denaturante per la concentrazione 8 M di urea.

Per un gel di dimensioni 50 x 20 cm, spessore 0.4 mm sono preparati 50 ml di gel al 6%, miscelando i seguenti reagenti:

- 10 ml di 30% acrilammide-N,N'bisacrilammide (19:1)
- 10 ml di 5X TBE
- 10 ml di H₂O
- 24 g urea in polvere

La soluzione è posta in agitazione e riscaldata fino al completo discioglimento dell'urea. Sono aggiunti quindi i catalizzatori della polimerizzazione del gel, 350 µl di 10% ammonio persolfato e 18 µl di N,N,N',N'-tetrametiletildiammina (TEMED). Il gel è immediatamente colato nello spazio tra i due vetri, separati da uno spaziatore di 0.4 mm; viene inserito il pettine e si lascia polimerizzare il gel per 60 min. Dopo la solidificazione, viene rimosso il pettine, il gel viene inserito nell'apparato di corsa e viene aggiunto il tampone di corsa (1X TBE) nella camera superiore ed inferiore. Il gel è sottoposto ad una precorsa di 30 min applicando un voltaggio costante di 1600 V o 53 W, che ne permette il riscaldamento essenziale per ottenere una buona corsa denaturante. Una volta sciacquati accuratamente i pozzetti, vengono caricati i campioni denaturati e applicato un voltaggio costante (1500-1600 V) per circa 2 ore. Al termine della corsa, viene disassemblato l'apparato ed il gel viene trasferito su un foglio di carta Whatman 3MM, essiccato nel gel dryer 583 (BioRad) per 2 ore a 80°C ed esposto in una cassetta Storage Phosphor Screen fino al momento della rilevazione del segnale mediante scanner ottico Storm 840 (Amersham Biosciences).

Tabella 2.

Oligonucleotidi utilizzati nelle reazioni di primer extension	
Nome	Sequenza (5'-3')
REV7	AGAGGACTAACTAAGAACCCTGG
REV7-35	TCCCTGGTTTCTCAGCTCAC
REV7-340	TGATGGAAATAAACAGGTGAGC

NORTHERN BLOT

Al fine di analizzare la lunghezza in bp di un trascritto, è stata utilizzata una corsa elettroforetica in gel di agarosio denaturante, seguita da trasferimento su membrana che permette il rilevamento della banda corrispondente al trascritto target per ibridazione ad una sonda complementare radioattiva.

Il gel denaturante è preparato sciogliendo l'agarosio utile ad ottenere una concentrazione finale dell'1% in H₂O milliQ. Dopo che la temperatura della soluzione sia arrivata a circa 50°C, si procede aggiungendo sotto cappa chimica la formaldeide (concentrazione finale 2.2 M) e il gel running buffer 5X diluito 5 volte.

Tabella 3.

Gel running buffer 5X	
3-N-morpholinopropanesulfonic acid (MOPS)	0.1 M
Sodio acetato (NaAc)	40 mM
EDTA	5mM

Il gel è quindi pronto per essere colato nella vaschetta di elettroforesi con inserito il pettine per la formazione dei pozzetti di caricamento. Dopo 15 minuti viene tolto il pettine ed il gel solidificato viene immerso in gel running buffer 1X. Si avvia una precorsa per equilibrare il gel a circa 5V/cm. Il campione di RNA totale è denaturato per aggiunta della mix di caricamento (gel running buffer 1X, 2.2M formaldeide, 50% formamide) e per riscaldamento a 65°C per 10 minuti. Il campione viene raffreddato in ghiaccio e viene addizionato di loading dye (concentrazione finale 1X), quindi è pronto per il caricamento. Allo stesso modo vengono trattati 3µg di RNA Ladder (Invitrogen), caricati nel gel come marker di peso molecolare con risoluzione 0.5-10 Kb. La corsa elettroforetica è avviata applicando un voltaggio di 5V/cm per 7 ore.

Al termine della corsa il gel viene immerso per 30 minuti in 3 volumi di TBE 0.5X con Gel Red utilizzato in diluizione 1:100000. Utilizzando uno spettrofotometro ed un righello è possibile acquisire l'immagine del gel con le relative bande dell' RNA Ladder e dell' RNA ribosomiale di ogni campione. In seguito il gel è immerso per 30 minuti in 3 volumi di TBE 0.5X. Il trasferimento dell'RNA dal gel alla membrana di nylon Hybond N+ (Amerham biosciences) è effettuato mediante trasferimento semi-dry con Trans Blot Turbo (BioRad), secondo le indicazioni della ditta produttrice per 35 minuti a 20V costanti a 4°C. L'RNA trasferito sulla membrana viene fissato mediante irraggiamento UV a 125mJ (GS Gene Linker UV Chamber, BioRad), dopo immersione in SSC buffer 2X per 5 minuti e successiva asciugatura all'aria.

Tabella 4.

SSC Buffer 20X (pH7)	
NaCl	3 M
Citrato di sodio	0,3 M

Prima dell'ibridazione alla sonda radioattiva, la membrana è lasciata a pre-ibridare per minimo un'ora alla stessa temperatura di ibridazione, utilizzando la stessa soluzione di ibridazione mancante della sonda stessa.

Tabella 5.

Soluzione di ibridazione	
formamide	50%
SDS	0.5%
SSC buffer	5X
Blocking Solution (Roche)	2%

La sonda radioattiva complementare all'RNA target è aggiunta dopo denaturazione a 95°C per 5 minuti direttamente alla soluzione di ibridazione. Il giorno seguente la membrana è recuperata dopo aver effettuato lavaggi consecutivi a bassa ed alta stringenza:

- 2 lavaggi veloci a temperatura ambiente con una soluzione a bassa stringenza (1% SDS, SSC1X)
- 3 lavaggi di 5 minuti alla temperatura di ibridazione con una soluzione ad alta stringenza (0.1% SDS , SSC 0.2X)
- Un lavaggio veloce in SSC 0.1X

La membrana è esposta in una cassetta Storage Phosphor Screen fino al momento della rilevazione del segnale mediante scanner ottico Storm 840 (Amersham Biosciences).

Al fine di identificare la lunghezza in bp dell'RNA target ibridato alla sonda vengono confrontate le posizioni delle bande ottenute sul blot con la posizione delle bande del marker di peso molecolare nel gel, poiché il gel di corsa e la membrana di trasferimento sono delle stesse dimensioni.

Oligonucleotidi utilizzati nelle reazioni di ibridazione	
Nome	Sequenza (5'-3')
REV1	TGCCATCCTTCAGTTATCAC
REV2	ACCACCATTCTTCAGTTATCAC

RAPID AMPLIFICATION OF CDNA ENDS (3'RACE)

Al fine di identificare il 3' terminale del trascritto primario del miR-101-1 (pri-miR-101-1), è stata utilizzata la tecnica 3'RACE. Tale metodica sfrutta la presenza della coda di poly(A), naturalmente presente nei pri-miR trascritti dalla RNA polimerasi II, come sito di attacco di un primer antisenso oligo(dT) con una sequenza adattatrice (Oligo-dT-adaptor primer). La prima fase consiste in una reazione di retrotrascrizione utilizzando 10 µg di RNA cellulare, 100 pmol di Oligo-dT-adaptor primer ed il Kit Maxima Reverse Transcriptase (Fermentas), secondo le indicazioni della casa produttrice. Il cDNA così prodotto è purificato mediante digestione con RNase A (Thermo Scientific) ed estrazione con 1 volume di fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (25:24:1), seguita da un'ulteriore

estrazione con 1 volume di cloroformio:alcol isoamilico (24:1) e successiva precipitazione con 2.5 volumi di etanolo e 0.1 volumi di 3 M NaOAc pH 5.2. Il pellet di cDNA è risospeso in H₂O milliQ autoclavata. La seconda fase è una reazione di polimerizzazione a catena della polimerasi (PCR) utilizzando come oligonucleotide antisenso l'adaptor primer e come oligonucleotide senso un primer specifico (specific primer). La mix di reazione comprende 0.5µl di enzima Herculase II Fusion Enzyme, 5 µl di 10X Reaction Buffer (Agilent Technologies), ciascun primer alla concentrazione 0.25µM, dNTPs alla concentrazione di 250 µM ciascuno e H₂O milliQ a 25µl finali. Per aumentare la specificità della reazione di PCR, 2µl della prima reazione di PCR sono stati utilizzati per un'ulteriore reazione di amplificazione con un secondo primer senso specifico (nested specific primer), la cui sequenza è compresa nell'amplicone della prima PCR.

Tabella 6.

Oligonucleotidi	
Nome	Sequenza (5'-3')
Oligo-dT-adaptor primer	GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
Adaptor primer	GACTCGAGTCGACATCGA
specific primer	GAGCCTTCAGAGAGAGTAATGC
nested specific primer	TGCCCTGGCTCAGTTATCA

CLONAGGIO DEI PROMOTORI GENICI

Il vettore pGL3-Basic (Promega) è stato utilizzato per saggiare se le sequenze genomiche amplificate per PCR avessero proprietà di promotore genico. Tale vettore contiene un gene reporter della luciferasi per cui, se a monte di tale gene è clonata una sequenza che funge da promotore, l'enzima luciferasi è espresso nella cellula in modo direttamente proporzionale all'attivazione trascrizionale e all'attività enzimatica luciferasica.

ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO

Le cellule NCM460 sono state utilizzate per l'estrazione del DNA genomico mediante metodo fenolo/cloroformio. Il pellet cellulare è stato lisato in 1 ml di DNA buffer (250mM Tris-HCl pH 8, 125mM EDTA) incubando a 45°C dopo l'aggiunta di 100 µg di Proteinasi K, sodio dodecil solfato (SDS) alla concentrazione finale 1% e 10 µg di RNasi A.

L'estrazione del DNA genomico prevede l'aggiunta di un ugual volume di una soluzione di fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (25:24:1) pH8, agitazione e centrifugazione a 12000 g a 4°C; la fase superiore è addizionata di un ugual volume di cloroformio:alcol isoamilico (24:1), e allo stesso modo è sottoposta ad agitazione e centrifugazione.

La fase acquosa contenente il DNA è prelevata ed addizionata di 0.1 volumi di Sodio Acetato 3M pH5.2 e 3 volumi di isopropanolo. La precipitazione del DNA avviene a freddo lasciando il campione a -80°C per un'ora oppure -20°C per una notte e poi centrifugando per 30 minuti a massima velocità a 4°C. Il pellet di DNA ottenuto è lavato con etanolo 70%, centrifugato a 8000g per 10 minuti a 4°C ed asciugato all'aria per 5 minuti finché non evapori l'etanolo residuo. Successivamente il DNA risospeso in H₂O milliQ autoclavata è analizzato quantitativamente mediante spettrofotometro (Nanodrop ND-1000, Celbio) e qualitativamente mediante corsa elettroforetica in gel di agarosio.

AMPLIFICAZIONE DEL DNA MEDIANTE PCR

La sequenza genomica di 8 kb a monte del locus genico è stata amplificata mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) in ampliconi sovrapposti di lunghezza circa 1 kb, disegnando degli oligonucleotidi con il software Beacon Designer 5.0 (**Tabella 7**).

Le reazioni di PCR sono state eseguite in un termociclatore T100 Bio-Rad utilizzando 1µl di enzima Herculase II Fusion Enzyme (Agilent Technologies). In ciascuna reazione, 100ng di DNA genomico sono uniti a 12,5 pmoli di ciascun oligonucleotide specifico in un

volume finale di 50 µl contenente anche i dNTPs alla concentrazione di 250 µM ciascuno e 10 µl di 10X Reaction Buffer. La reazione di PCR è eseguita con 40 cicli di amplificazione, in cui il DNA viene denaturato a 95°C per 30 secondi, segue il passaggio di annealing alla temperatura appropriata per 30 secondi, infine l'estensione a 72°C per 1 min. Per aumentare la specificità delle singole reazioni sono state eseguite delle touchdown PCR, in cui la temperatura di appaiamento ad ogni ciclo successivo viene abbassata da un iniziale valore superiore alla T_m attesa fino ad un valore inferiore alla T_m. Tale protocollo mantiene inizialmente molto alta la stringenza dell'ibridazione, scoraggiando la formazione di aspecifici e consentendo alla sequenza desiderata di predominare.

Tabella 7.

Oligonucleotidi	
Nome	Sequenza (5'-3')
REV 1a	CCTTTAGAATAGACAGCATCAGC
FW 1	CCAGTTGATGGAGTTGGACA
REV 2	CCTTTAGAATAGACAGCATCAGC
FW 2	TGTCTCCATACTTACCCAACC
REV 3	AGGTCATCATCTAGGTCTTAGC
FW 3	TGTA CTCCACATTGATTGATCG
REV 4	CACTTATAGAAA ACTGGCACACC
FW 4	TAGTGCTGTCTTTGGGTTTTG
REV 5	ATCTTATTTCTCAAGTCAACAGG
FW 5	TGACTGATAACCCTGGACAAAG
REV 6	CAACCAGAAAGTCATCTTACAGC
FW 6	ATTAGAAACATTATTGGGGAGAGG
REV 7	AGAGGACTAACTAAGAACCCTGG
FW 7	TGTAAATAGAGCCTGGATGTTG
REV 8	AGAGGACTAACTAAGAACCCTGG
FW 8	CGGACTGGGTTTGTGTTG

CLONAGGIO

Per clonare il prodotto di PCR all'interno del vettore pGL3 è necessario che entrambi, amplicone e plasmide, mostrino delle estremità libere per permettere la reazione di ligazione. A tale scopo è eseguita una seconda reazione di PCR sull'amplicone di interesse

con degli oligonucleotidi che comprendono la sequenza dei siti di restrizioni (reverse primer con sito Bgl II e forward primer con sito Mlu I, **tabella 8**).

Tabella 8.

Oligonucleotidi	
Nome	Sequenza (5'-3')
rsREV 1	GAAGATCTCCTTTAGAATAGACAGCATCAGC
rsFW 1	TCGACGCGTCCAGTTGATGGAGTTGGACA
rsREV 2	GAAGATCTCCTTTAGAATAGACAGCATCAGC
rsFW 2	TCGACGCGTTGTCTCCATACTTACCCAACC
rsREV 3	GAAGATCTAGGTCATCATCTAGGTCTTAGC
rsFW 3	TCGACGCGTTGTACTCCACATTGATTGATCG
rsREV 4	GAAGATCTCACTTATAGAAAACCTGGCACACC
rsFW 4	TCGACGCGTTAGTGCTGTCTTTGGGTTTTG
rsREV 5	GAAGATCTATCTTATTTCTCAAGTCAACAGG
rsFW 5	TCGACGCGTTGACTGATACCCTGGACAAAG
rsREV 6	GAAGATCTCAACCAGAAAGTCATCTTACAGC
rsFW 6	TCGACGCGTATTAGAAACATTATTGGGGAGAGG
rsREV 7	GAAGATCTAGAGGACTAACTAAGAACCCTGG
rsFW 7	TCGACGCGTTGTAAATAGAGCCTGGATGTTG
rsREV 8	GAAGATCTAGAGGACTAACTAAGAACCCTGG
rsFW 8	TCGACGCGTCGGACTGGGTTTGTGTTG

I prodotti di amplificazione purificati e il plasmide pGL3 Basic sono quindi sottoposti a doppia digestione con 20 unità di ciascun enzima di restrizione Mlu I e BglII (Fermentas) in Tango Buffer 2X per 6 ore a 37°C. Le sequenze digerite sono state separate elettroforeticamente in gel d'agarosio e le bande d'interesse sono state estratte utilizzando il kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel), seguendo le indicazioni fornite dalla casa produttrice. La procedura prevede la lisi del gel e la purificazione del DNA mediante l'utilizzo di una colonna con matrice di silice NucleoSpin Extract. In presenza di sostanze caotropiche il DNA si lega alla matrice di silice e successivamente può essere eluito con un buffer a bassa concentrazione salina. Il DNA purificato è stato quantificato e utilizzato nella reazione di ligazione.

La reazione di ligazione è stata effettuata a 22°C per 2 ore utilizzando i seguenti reagenti (Fermentas): 1 unità di T4 DNA ligasi, 1ul di T4 DNA ligasi buffer, 100 ng di vettore linearizzato e l'inserto in rapporto molare rispetto al vettore di 2:1 / 5:1 / 10:1.

TRASFORMAZIONE DEI BATTERI COMPETENTI

Il prodotto di ligazione è utilizzato per la trasformazione di batteri DH5α E. coli, resi competenti chimicamente utilizzando una metodica che prevede l'uso di CaCl₂. Ad ogni aliquota di batteri (90 μl) è stato aggiunto il prodotto di ligazione (10μl) e, dopo un'incubazione in ghiaccio di 30 min, viene eseguito uno shock termico, ponendola prima a 42°C per 1 minuto, poi in ghiaccio per 2 minuti. Ai batteri sono stati aggiunti 200 μl di terreno LB e sono stati lasciati a crescere per 1 ora a 37°C in agitazione. I batteri così trasformati sono stati piastrati su terreno solido contenente LB e ampicillina alla concentrazione finale di 100 μg/ml, e lasciati crescere overnight a 37°C. Poiché il ceppo è sensibile all'antibiotico, cresceranno soltanto i cloni trasformati che quindi hanno inglobato il vettore pGL3 Basic contenente un gene che conferisce resistenza all'ampicillina.

Tabella 9.

Terreno LB (Luria-Bertani) pH 7	
Componenti	Quantità
Triptone	16g
Estratto di lievito	10g
NaCl	5g
per ottenere un terreno di crescita solido aggiungere Agar	15g
H ₂ O milliQ	portare a 1l

SCREENING DELLE COLONIE TRASFORMATE

Le colonie positive alla trasformazione e quindi contenenti l'inserto sono state analizzate mediante 2 tipi di screening. La PCR Colony è un metodo di screening che permette di

effettuare un'analisi del clonaggio mediante PCR direttamente sulla colonia in esame. La colonia batterica da testare è pescata direttamente dalla piastra con un puntale poi immerso in 25µl di reazione di PCR. In questo caso per l'amplificazione è stato usato il kit DreamTaq DNA Polymerase (Fermentas) con 0.4 mM di ciascun primer (vedi **tabella 7**), 0.2 mM di ciascun dNTP, 1 unità di enzima e 2.5 µl di Buffer.

Le colonie positive alla PCR amplificano l'inserto che è visualizzato al transilluminatore in un gel di agarosio in seguito a corsa elettroforetica.

Verificata la dimensione del frammento, i cloni positivi sono stati fatti crescere una notte in agitazione a 37°C in terreno di crescita LB con 100µg/ml Ampicillina, per poi procedere alla purificazione del DNA plasmidico mediante NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel).

I plasmidi estratti sono stati sottoposti al secondo screening mediante digestione con enzimi di restrizione, sia gli stessi usati per il clonaggio sia altri con siti unici all'interno dell'inserto clonato. Le bande di plasmide attese sono state controllate al transilluminatore in un gel di agarosio in seguito a corsa elettroforetica.

TRANSFEZIONE TRANSIENTE

I plasmidi pGL3 con gli inserti desiderati sono stati usati per trasfettare in modo transiente le cellule NCM460. La trasfezione è stata eseguita con Lipofectamine TM 2000 (Invitrogen) su cellule seminate ad una confluenza dell'80% in piastre multiwell da 24 pozzetti il giorno precedente la trasfezione in terreno DMEM senza antibiotici. Ogni pozzetto è transfettato con 800 ng del plasmide pGL3 con l'inserto di cui si vuole saggiare l'attività di promotore, e con 75 ng di un secondo vettore reporter del gene renilla pRL (Promega), utilizzato come controllo interno per la normalizzazione nell'analisi dei dati. Il terreno di trasfezione è OptiMEM (Gibco) senza siero ed antibiotico, e viene rimosso a distanza di 6 ore dalla trasfezione, sostituendolo con terreno DMEM senza antibiotici.

SAGGIO DI LUCIFERASI

Dopo 24 ore le cellule possono essere lavate con PBS 1X e usate per effettuare il saggio di luciferasi utilizzando il kit Dual Luciferase (Promega).

Tabella 10.

PBS 10X (pH 7.4)	
Componente	Concentrazione
NaCl	1.37M
KCl	27mM
Na ₂ HPO ₄	81mM
KH ₂ PO ₄	19mM

Le cellule sono raccolte in Passive Lysis Buffer 1X e 20 µl di lisato sono stati trasferiti in un tubo da lettura luminometrica. L'attività della luciferasi Firefly è analizzata per aggiunta del substrato LAR II con analisi della luminescenza d'emissione. Allo stesso campione è poi aggiunto il substrato Stop&Glo per la luciferasi Renilla, contenente un inibitore della luciferasi di Firefy, e l'attività di questa è analizzata con una seconda misura di luminescenza di emissione. Ogni esperimento è stato ripetuto sei volte e i dati sono stati analizzati statisticamente applicando il t-test di Student.

IMMUNOPRECIPITAZIONE DELLA CROMATINA

Circa 1.5×10^7 cellule sono state utilizzate per ogni reazione di immunoprecipitazione. In una prima fase le cellule sono sottoposte a crosslinking utilizzando formaldeide alla concentrazione dell'1% direttamente nel terreno di coltura, per 10 minuti in agitazione a temperatura ambiente. Per arrestare la reazione di crosslinking tra proteine e DNA si aggiunge la glicina 0.125 M, per 10 minuti in agitazione a temperatura ambiente. In ghiaccio le cellule fissate sono lavate e raccolte in PBS 1X con aggiunta di PMSF 1mM, quindi centrifugate a 1500 rpm per 5 minuti a 4°C. Dopo ulteriori 3 lavaggi con PBS 1X, il pellet cellulare è risospeso in 500 µl Cell Lysis Buffer freddo ed è lasciato in ghiaccio per 10 minuti. Il pellet cellulare è ottenuto centrifugando a 3000 rpm per 5 minuti a 4°C. La

lisi nucleare è ottenuta mediante risospensione dei nuclei in 600 µl RIPA buffer freddo, incubazione in ghiaccio per 30 minuti, e sonicazione in tubi da 15 ml mediante 6 cicli di sonicazione di 10 minuti (30 secondi di ultrasuoni alternati a 30 secondi di pausa) ad alta potenza in un bagnetto freddo per l'aggiunta di acqua e ghiaccio con Bioruptor (Diogene). Il campione è centrifugato a 14000 rpm per 15 minuti a 4°C ed il surnatante contenente il DNA genomico è trasferito in un nuovo tubo. Il campione è sottoposto a pre-clearing per aggiunta di 50 µl di Immobilized Protein A (Pierce) ed incubazione in rotazione costante a 4°C per 15 minuti. Il surnatante contenente la cromatina è raccolto dopo centrifugazione a 3000 rpm per 5 minuti a 4°C. Un'aliquota (50 µl) è utilizzata come INPUT DNA, mentre ai restanti 600 µl sono aggiunti circa 5 µg di anticorpo specifico o anticorpo di controllo IgG, e lasciati in rotazione a 4°C fino al giorno dopo. In questa fase l'anticorpo specifico riconosce la proteina target fissata al DNA. La fase successiva prevede il legame dell'anticorpo a 50 µl di biglie di agarosio rivestite di proteina A (Pierce) incubando in rotazione per 30 minuti a temperatura ambiente. Centrifugando il campione a 4000 rpm per 5 minuti a temperatura ambiente, si isolano le biglie di agarosio che legano il complesso anticorpo-proteina target-DNA. Le biglie sono sottoposte a lavaggi consecutivi con 1 ml di buffer in rotazione per 3 minuti e centrifugazione a 3000 rpm per 2 minuti: 4 volte con RIPA buffer, 4 volte con Washing buffer e 2 volte con TE buffer. A questo punto è necessario isolare il DNA mediante una reversione del cross-linking ed estrazione fenolo-cloroformio. In breve, rispendere le biglie in 200 µl di TE buffer, aggiungere 10 µg RNase A e incubare a 37°C per 30 minuti; quindi aggiungere 50 µl di Proteinase K Buffer 5X e 6 µl Proteinase K (19 mg/ml) ed incubare a 65°C in uno shaker at 950 rpm per 6 ore. Centrifugare a 14000 rpm per 10 minuti a 4°C e trasferire il surnatante in un nuovo tubo per eseguire un'estrazione con 1 volume di fenolo:cloroformio:alcol isoamilico (25:24:1), seguita da un'ulteriore estrazione con 1 volume di cloroformio:alcol isoamilico (24:1) e

successiva precipitazione a -80°C per 1 ora con 2.5 volumi di etanolo, 0.1 volumi di 3 M NaOAc pH 5.2, 20 μg di glicogeno e 10 μg di Salmon Sperm. Dopo una centrifugazione a 14000 rpm per 30 minuti at 4°C , il pellet di DNA è lavato con etanolo 70%, ed il pellet asciugato all'aria è risospeso in H_2O milliQ autoclavata. Circa 100ng di DNA immunoprecipitato e di INPUT DNA sono usati per ogni reazione di Real Time PCR.

Tabella 11. Soluzioni utilizzate per il protocollo di ChIP.

CELL LYSIS BUFFER	
Componenti	Concentrazione
PIPES pH 8	5 mM
KCl	85 mM
NP40	0,5%
PMSF	1 mM
inibitori delle proteasi (Complete, Roche)	1X

PK BUFFER 5X	
Componenti	Concentrazione
TrisHCl pH 7,5	50 mM
EDTA	25 mM
SDS	1,25%

WASHING BUFFER	
Componenti	Concentrazione
NP40	1%
Sodio deossicolato	1 %
TrisHCl pH 8	100 mM
LiCl	500 mM
PMSF	1 mM
inibitori delle proteasi (Complete, Roche)	1X

RIPA buffer	
Componenti	Concentrazione
NP40	1%
NaCl	150 mM
Sodio deossicolato	0,5 %
SDS	0,1%
TrisHCl pH 8	50 mM
PMSF	1 mM
inibitori delle proteasi (Complete, Roche)	1X

REAL TIME PCR

La tecnica Real Time PCR è utilizzata per analisi di espressione genica e per valutare l'arricchimento di una sequenza in un campione immunoprecipitato. La tecnica prevede una quantificazione dell'amplicone ad ogni ciclo di PCR, che è direttamente proporzionale alla fluorescenza emessa da una sonda capace di intercalarsi nella doppia elica di DNA,

grazie all'utilizzo di un termociclatore dotato di laser e di uno scanner per la stimolazione e registrazione della fluorescenza emessa dalla sonda. Per quantificare i livelli di espressione del miR-101, l'RNA estratto è sottoposto a trattamento con DNase TURBO DNA-free™ (Ambion) e successivamente retrotrascritto in cDNA che viene utilizzato nella reazione di PCR. Poiché la sequenza del miR-101 è di 22 paia di basi non è possibile utilizzare una coppia di primer canonici. A tale scopo si utilizza nella reazione di retrotrascrizione un "primer loop" cioè un oligonucleotide che per parte della sua sequenza si appaia al 3' del miR e per la restante parte è costituito da una sequenza in grado di ripiegarsi su se stessa formando un'ansa. In tal modo il primer funge da innesco e allunga il prodotto di retrotrascrizione. Nella successiva reazione di PCR l'oligonucleotide senso sarà uguale alla sequenza del miR-101 e quello antisenso sarà uguale all'estremità 5' del primer loop.

L'analisi dei dati è di tipo quantitativa relativa, cioè i livelli di amplicone sono analizzati rispetto ad un amplicone di riferimento. Nel caso di quantificazione di trascritti l'amplicone di riferimento è prodotto da un trascritto costitutivamente espresso come l'snRNA U6 o la β -glucuronidasi GUSB. Nel caso di quantificazioni di una sequenza immunoprecipitata l'amplicone di riferimento è prodotto da una sequenza di DNA che si ritiene non essere arricchita nel campione. L'analisi effettuata è in accordo con il metodo DDCT.

Tabella 12. Oligonucleotidi.

Oligonucleotidi per quantificare miR-101	
Nome	Sequenza (5'-3')
Primer loop	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATA CGACTTCAGTT
Rev 101 loop	TGCAGGGTCCGAGGTAT
Fw 101	GCCGCTACAGTACTGTGA
Rev U6	AAAATATGGAACGCTTCACG
Fw U6	CTTCGGCAGCACATATACT
Oligonucleotidi utilizzati per analisi di saggi ChIP	
FW1	CGGCGGCGACTGTAAATAG
REV1	CGGTCTTCCTCTCTCTCC

FW2	TTCGGGAACGCCTTCTC
REV2	CAGCACAAATTACAGCAAAGC
FW3	GTCGGTTTTTCAGGAAGGG
REV3	TCAAAGCAGGGATAAGCAC
FW4	GTCTTCTAATGGAATCTGCTGTC
REV4	GGGTGTGTCTTCTGCTTGG
c-MYC REV	GGAGAGCCTTTCAGAGAAG
c-MYC FW	GCACTGGAACTTACAACAC
AXIN FW	GTTACCTGGAAGACGAAGG
AXIN REV	TCTGGAGGCGTTCAGTTG
CN FW	TGACTGATACCCTGGACAAAG
CN REV	CAACCAGAAAGTCATCTTACAGC
Oligonucleotidi per quantificare il pri-miR-101-2	
T1 FW	GGCTATTGGACAAAATAACGAATG
T1 REV	AAAGAGTGAGAAACAGGAATGC
T2 FW	ACACAGATCACATGAAAGGAG
T2 REV	CAAGGCTAGGAACCAGACC
T3 FW	GGTGGATGCGTAGACTCG
T3 REV	GGATTAAGGAAGGAAAGAAATGC

ANALISI STATISTICA

Ogni esperimento è stato eseguito almeno in triplo. Tutti i dati sono espressi come media +/- DS dei tre diversi esperimenti. L'analisi della varianza è eseguita mediante *il test t di Student* per rilevare medie con differenze significative tra i trattamenti ($P < 0.05$).

RISULTATI

IDENTIFICAZIONE DEI TRASCRITTI PRIMARI DEL MIR-101

STUDIO BIOINFORMATICO DI PREDIZIONE

Per la predizione dei trascritti primari del miR-101 sono stati utilizzati gli strumenti di visualizzazione ed estrazione di dati genomici sul sito web bioinformatico *UCSC Genome Browser*. In un contesto genomico le diverse annotazioni, come la presenza di geni, sono visualizzate in rappresentazioni grafiche. **Le figura 8 e 9** rappresentano la visualizzazione delle tracce utilizzate per la predizione dei pri-miR-101. In alto è mostrata la regione cromosomica che contiene il miR-101 e che è stata utilizzata per lo studio di predizione. Per il miR-101-1 la regione è di circa 10 000 paia di basi, ed inquadra per la maggior parte la regione a monte della sequenza del miR-101 maturo. Il miR è visualizzato nella prima traccia della figura (in blu) a monte del sito del miR-3671 e si trova sul filamento negativo del cromosoma, perciò verso sinistra è possibile ricercare il 3' terminale del trascritto primario e verso destra il 5' terminale. In verde la traccia *TransMap* allinea le sequenze caratterizzate come geni noti (mRNA e sequenze geniche) e quelle non ancora caratterizzate ma comunque presenti nel trascrittoma dette EST (expression sequence tags). Tale traccia mostra che esiste un allineamento che comprende il miR-101-1 ed una regione a monte di esso di circa 8 000 bp. Più in basso sono indicate in forma condensata la presenza di EST umane e non. In particolare 4 diversi sequenziamenti del trascrittoma di *Mus Musculus* identificano le estremità di questa sequenza. Sebbene l'intera regione genomica sia mediamente conservata (ultime due tracce, in blu e nero), la regione che dovrebbe corrispondere al sito di inizio della trascrizione è molta conservata nelle due specie animali. La traccia *Poly(A)-Tail Sequencing* indica un segnale di poliadenilazione a

circa 500 bp a valle della sequenza del miR-101. Le altre tracce permettono di predire se esistono regioni con caratteristiche di promotore e sono indicate a partire da quella in posizione più alta:

1. Poiché le nucleasi non agiscono su DNA assemblato in nucleosomi, i siti ipersensibili alla DNAsi I si formano in seguito al legame di fattori di regolazione non-istonici al DNA, quindi tali siti rappresentano regioni di promotori ed enhancer; in figura il grado di sensibilità alle DNAsi aumenta dal colore bianco al nero e si accumulano a partire dalla regione a 7 kb a monte della sequenza del miR-101.
2. La traccia bioinformatica detta “*Chromatin State Segmentation*” opera una classificazione delle sequenze in base alle relative modificazioni istoniche e siti di legame a fattori implicati nella trascrizione genica, come la RNA Pol II; in rosso sono i promotori fortemente attivi, in rosa i promotori deboli, in giallo deboli enhancer, in verde regioni trascritte poco, in blu gli insulator e in grigio regioni eterocromatiniche quindi non trascritte. Tali caratteristiche sono riportate per 2 linee cellulari, la linea endoteliale HUVEC e la linea di epatocarcinoma HepG2.
3. La successiva traccia mostra le modificazioni istoniche più significative della presenza di un promotore genico in 2 linee cellulari, quali la trimetilazione dell’istone H3 sulla lisina 4 (H3K4me3) e l’acetilazione dell’istone H3 sulla lisina 27 (H3K27Ac); la trimetilazione sulla lisina 36 dell’istone H3 invece si ritiene sia un marcatore di regioni codificanti H3K36m3.
4. Esistono delle isole CpG a circa 7,7 kb a monte della sequenza del miR-101 (in verde scuro);

5. La traccia *SwitchGear Genomics Transcription Start Sites* predice la presenza di un sito di inizio della trascrizione a più di 8 kb a monte della sequenza del miR-101.
6. La presenza di siti di legame ai fattori di trascrizione ha una maggiore confidenza se tali siti sono conservati in diverse specie. La traccia *Conserved Transcription Factor Binding Site* mostra che esistono tali siti altamente conservati nei mammiferi in regioni a circa 7 kb a monte della sequenza del miR-101.

In **figura 9** è mostrata la regione cromosomica utilizzata per l'analisi di predizione del pri-miR-101-2. La regione mappa sul filamento positivo del cromosoma 9, precisamente nel segmento p24. La regione è di circa 70 000 paia di basi, ed inquadra la sequenza dell'intero gene RCL-1, nel cui ottavo introne è la sequenza del miR-101 maturo (in rosso). Poiché il miR si trova sul filamento positivo del cromosoma, a sinistra è possibile ricercare il 5' terminale del trascritto primario. Nella prima traccia sono indicati i 2 trascritti che codificano per il gene RCL-1, ed entrambi comprendono nell'ultimo introne il miR-101-2. Numerose sono le EST sequenziate in tale regione genomica, mentre in figura 9 sono riportate solo quelle di maggior rilievo ai fini di un'analisi predittiva genica. In verde la traccia *TransMap* indica la possibilità di 3 possibili trascritti con sito di inizio della trascrizione differente, mentre fra le EST umane sono mostrati 7 inizi di trascrizione, escluso quello dell'isoforma lunga del gene RCL-1. Di tutte queste EST, soltanto la quarta e la quinta non hanno un 5' terminale in corrispondenza di un esone di RCL-1. L'ipersensibilità alla DNAsi I sembra essere una caratteristica diffusa su tutta la regione, ma 2 addensamenti (in nero) risultano vicino al sito di inizio della trascrizione del trascritto lungo del gene RCL-1 e nella regione a monte del sito di inizio del trascritto corto. La traccia "*Chromatin State Segmentation*" non riporta altre regioni a possibile attività di promotore oltre quella della forma lunga di RCL-1, e nemmeno particolari differenze nelle

caratteristiche regolative delle sequenze analizzate nelle 2 linee cellulari, diversamente dall'analisi del pri-miR-101-1. Le modificazioni istoniche caratteristiche di un promotore e la presenza di siti di legame a fattori di trascrizione conservati nei mammiferi confermano che in una regione a circa 15 kb a monte del sito del miR-101 può esistere un promotore alternativo. In particolare l'acetilazione della lisina 27 dell'istone H3, caratteristica di un promotore attivo trascrizionalmente, è presente solo nella linea cellulare leucemica K562 e non nella linea embrionale staminale H1-hESC, in cui dati di letteratura indicano una repressione dell'espressione del miR-101. Infine anche la traccia *SwitchGear Genomics Transcription Start Sites* indica la presenza di 3 possibili inizi della trascrizione nella regione genomica mostrata.

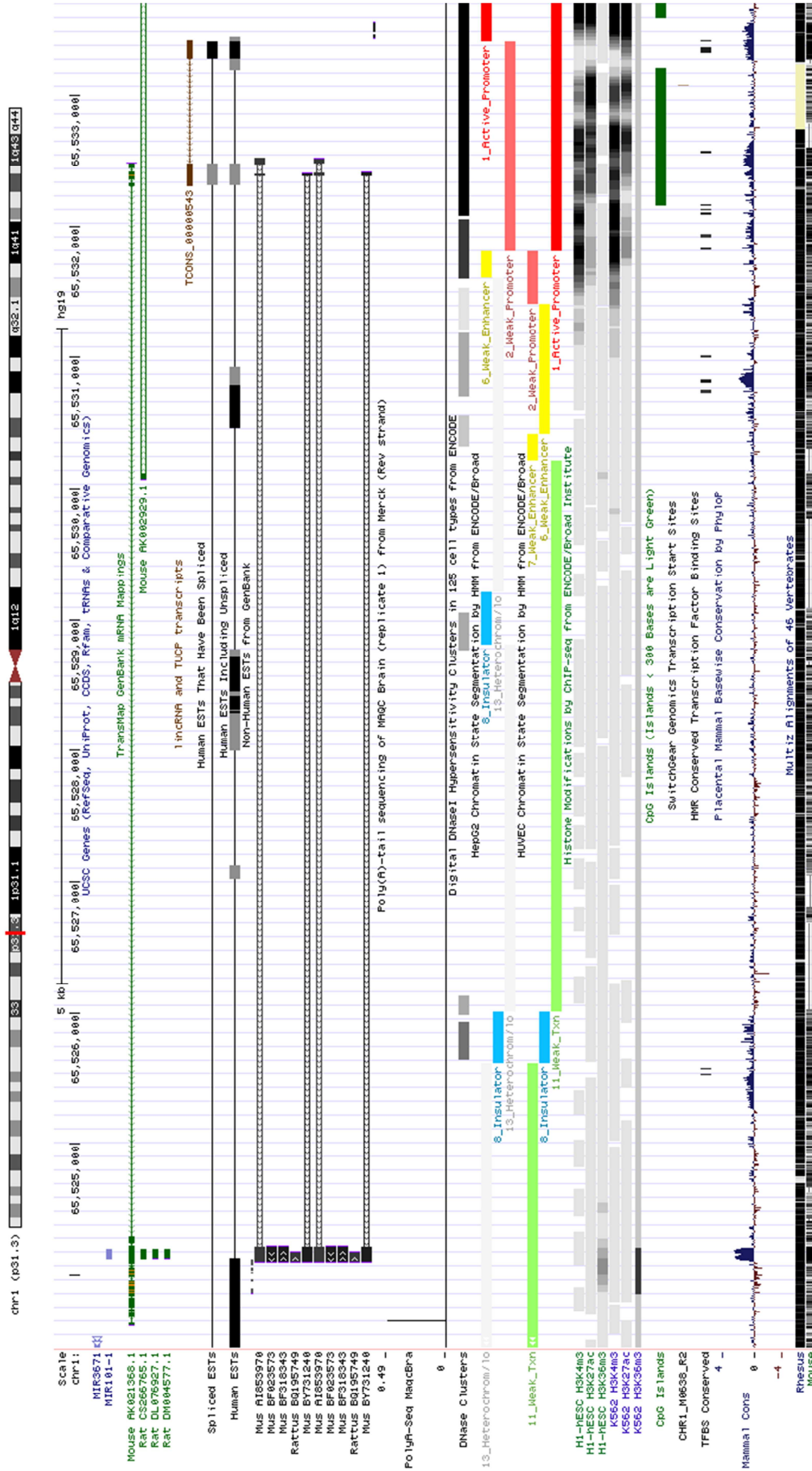


Figura 8. Studio di predizione del pri-miR-101-1 (*UCSC Genome Browser*).

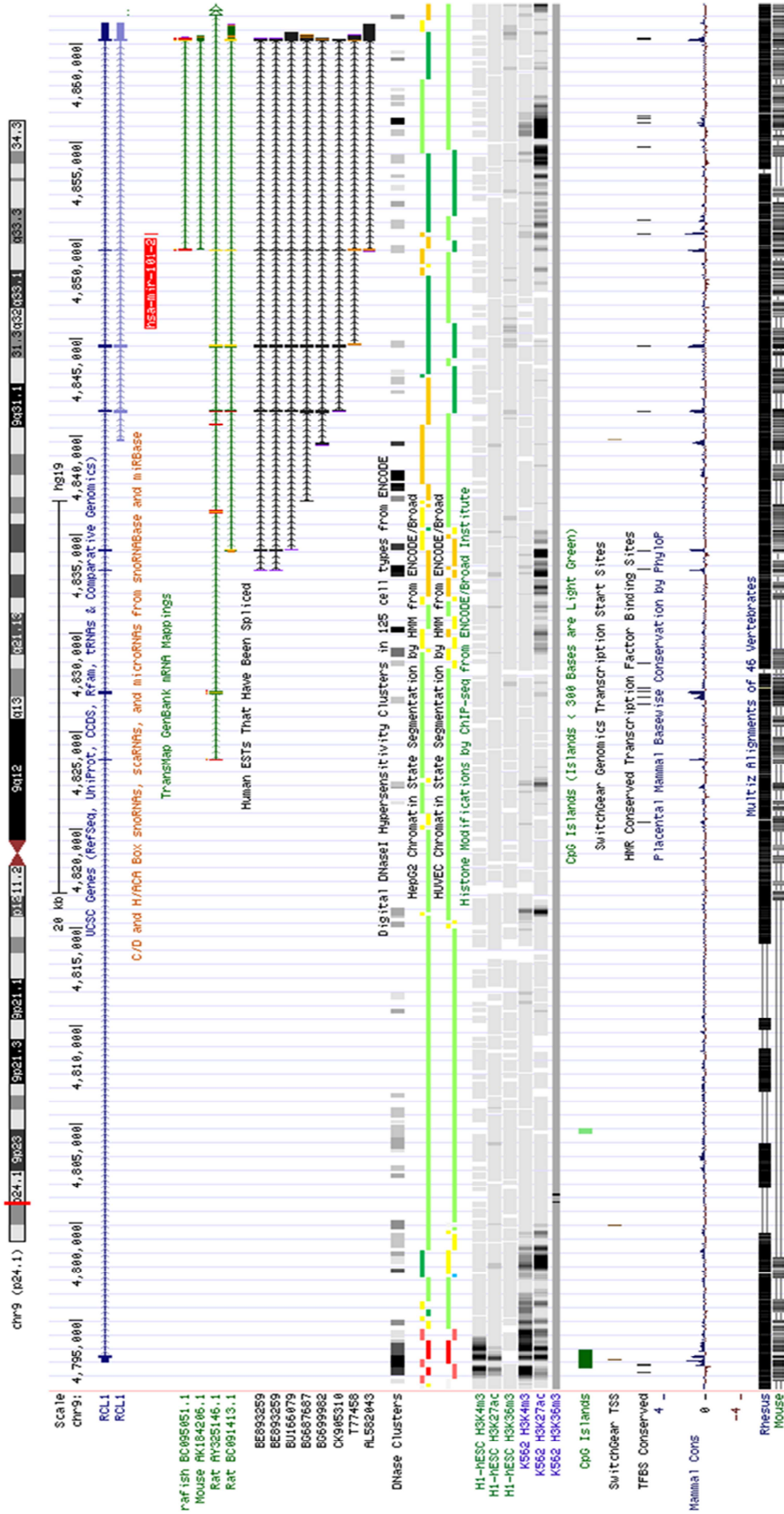


Figura 9. Studio di predizione del pri-miR-101-2 (*UCSC Genome Browser*).

IDENTIFICAZIONE DEL TRASCritto PRIMARIO DEL miR-101-1

Allo scopo di utilizzare il miglior sistema cellulare per l'identificazione del pri-miR-101-1 si è voluto identificare la linea cellulare che più esprimesse il trascritto stesso mediante una tecnica di retrotrascrizione (RT) seguita da un'amplificazione per PCR. 30 µg di RNA totale DNA-free di 5 linee cellulari (SKNBE, HUVEC, SW620, HCA7 e NCM460) sono stati utilizzati per ogni reazione di retrotrascrizione (RT). I primer antisenso utilizzati sono stati 2, entrambi complementari a parte della sequenza del pre-miR-101-1 (REV1 e REV1a). Il cDNA prodotto è stato purificato e 1 µg è stato utilizzato per una reazione di PCR. Come oligonucleotidi d'innescò della reazione di amplificazione sono stati utilizzati gli stessi antisenso della reazione di RT e un primer senso (FW1), in modo tale da ottenere un amplicone di 856 bp con il REV1 e 827 bp con il REV1a.

Come mostrato in figura 10, l'amplicone è più abbondante per il campione ottenuto dalla linea NCM460, per cui questa linea cellulare è stata utilizzata per gli studi d'identificazione del pri-miR-101-1.

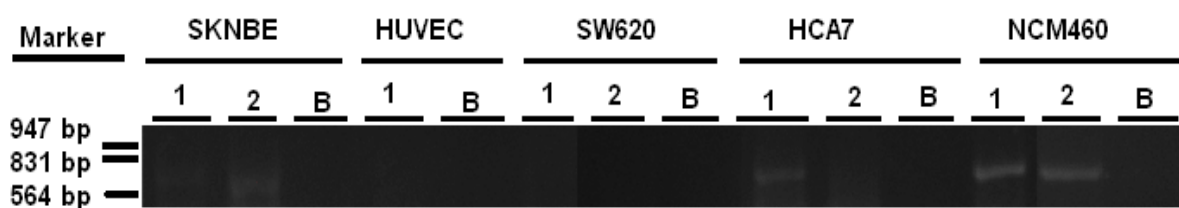


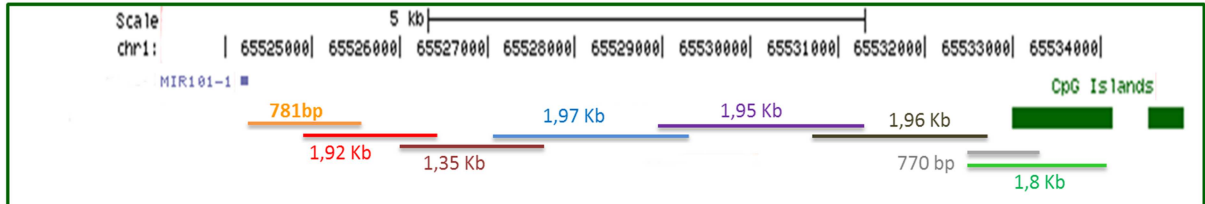
Figura 10. Analisi per RT e PCR dell'espressione trascrizionale di un frammento del pri-miR-101-1. Nel gel all' 1% di agarosio mostrato sopra, i prodotti di PCR sono stati caricati e fatti correre a 70V costanti. Per ogni linea cellulare il campione 1 rappresenta l'amplicone di 856bp e il campione 2 quello di 827 bp, mentre il campione B rappresenta il controllo negativo, ottenuto dalla mancata aggiunta dell'enzima RT alla reazione.

LA LUNGHEZZA DEL PRI-MIR-101-1

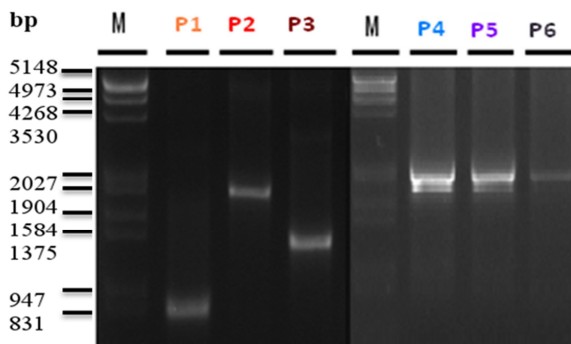
La stessa tecnica di RT-PCR è stata utilizzata per identificare l'estensione del pri-miR-101-1 nella sua regione a monte della sequenza del miR-101. Oligonucleotidi senso e antisenso

sono stati disegnati sulla sequenza a monte del miR-101-1 fino alla prima isola CpG in modo da ottenere degli ampliconi sovrapposti, cioè che si sovrappongono alle rispettive estremità (**Figura 11**).

(a)



(b)



(c)

- P1:** REV1a/FW1
- P2:** REV2/FW2
- P3:** REV3/FW3
- P4:** REV4/FW4
- P5:** REV5/FW5
- P6:** REV6/FW6
- P7:** REV7/FW7
- P8:** REV7/FW8

Figura 11. Amplificazione per RT-PCR touchdown del pri-miR-101-1. Le sequenze amplificate con gli oligonucleotidi in (c) si sovrappongono all'estremità come evidenziato in (a). Le coppie di primer P7 e P8 non hanno prodotto nessun amplicone. Il marker di pesi molecolari utilizzato è Lambda DNA/EcoR I + HindIII (Fermentas).

Per scongiurare la presenza di un prodotto di amplificazione dovuto alla presenza di residui di DNA genomico per ogni reazione di RT-PCR è stato effettuato un controllo negativo di reazione (non mostrato in figura). Il controllo è stato sottoposto alla stessa reazione di RT-PCR ma nella reazione di retrotrascrizione non è stato aggiunto l'enzima RT e non ha prodotto nessun tipo di amplicone.

Tale approccio ha confermato le analisi di predizione circa la presenza di trascritti in tale regione intergenica del genoma. Poiché gli ampliconi sono sovrapposti si può anche ipotizzare l'esistenza di un trascritto unico che comprende il miR-101-1 e si estende a circa 8 kb a monte dello stesso.

Per confermare la presenza di tale trascritto e conoscerne più precisamente la lunghezza è stato eseguito un saggio di Northern Blot. Tale tecnica consiste nel separare su un gel di agarosio denaturante le molecole di RNA cellulare in base alla propria lunghezza e di trasferirle su una membrana di nylon. A questo punto l'utilizzo di una sonda marcata radioattivamente con $\gamma^{32}\text{P}$ (REV1) complementare al pre-miR-101-1 ci permette di identificare la lunghezza del trascritto primario del miR-101-1. Circa 50 μg di RNA denaturato di NCM460 sono stati caricati nel gel di agarosio insieme ad un marcatore di pesi molecolari ad RNA e all'RNA batterico estratto da E.coli, come controllo negativo del saggio.

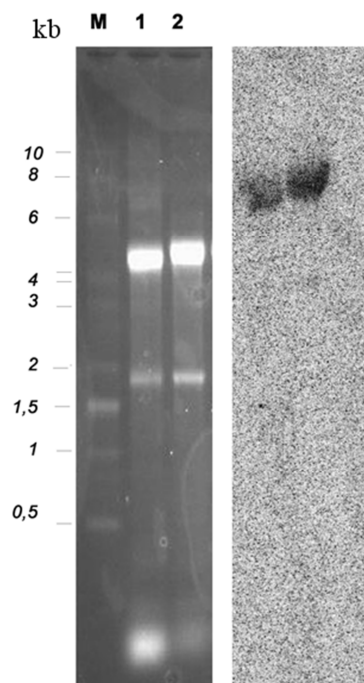


Figura 12. Identificazione del pri-miR-101-1 mediante saggio di Northern Blot. Il marker di pesi molecolari (M) utilizzato è RNA Ladder (Invitrogen). Nel gel di agarosio sono caricati due campioni di RNA totale cellulare di NCM460.

L'ESTREMITÀ 3' DEL PRI-MIR-101-1

Lo studio bioinformatico di predizione mostra la presenza di un sito di poliadenilazione a circa 500 bp a valle della sequenza del miR-101-1 (**Figura 8**). Un'analisi incrociata dei saggi di RT-PCR e Northern Blot indicano che la maggior parte del trascritto primario si identifica nella regione a monte del miR-101-1. Per identificare con esattezza il 3' terminale del pri-miR-101 è stata utilizzata una particolare reazione di RT-PCR detta 3'RACE. La reazione di RT infatti sfrutta la presenza di una coda di poli(A) per il riconoscimento dell'innesco della reazione (oligo-dT-adaptor primer). 10 ug di RNA cellulare sono utilizzati per ogni reazione ed il cDNA ottenuto è stato purificato prima di essere utilizzato nella successiva reazione di amplificazione. La prima reazione di PCR utilizza un adaptor primer (che rappresenta la forma troncata del primer utilizzato nell'RT) ed un primer specifico che mappa sulla sequenza del pre-miR-101-1. La **figura 13** mostra come non sia stato ottenuto nessun prodotto specifico da questa reazione. Quindi per aumentare la specificità della PCR, gli ampliconi ottenuti nella prima reazione sono utilizzati come stampo per una seconda PCR in cui il primer senso mappa in una regione compresa nell'amplicone atteso e nella sequenza del pre-miR-101-1. Il prodotto specifico di amplificazione è di circa 200 bp.

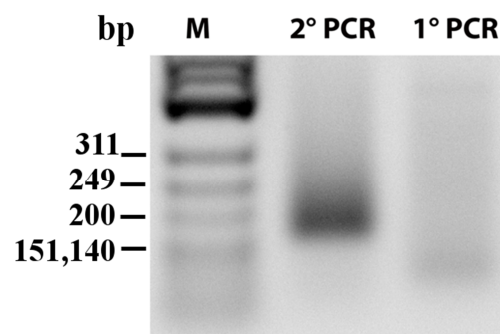


Figura 13. Saggio di 3'RACE per l'identificazione dell'estremità 3' del pri-miR-101-1.

L'ESTREMITÀ 5' DEL PRI-MIR-101-1

Le informazioni sulla lunghezza e sull'estremità 3' sono state il punto di partenza per uno studio sul sito di inizio della trascrizione del pri-miR-101-1. I saggi di primer extension permettono di identificare con precisione il sito di inizio della trascrizione. Una reazione di RT, che prevede l'utilizzo di un oligo antisenso marcato con $\gamma^{32}\text{P}$ all'estremità 5', produce un cDNA la cui lunghezza è pari alla distanza tra il sito di inizio della trascrizione e il sito di complementarità dell'oligo sul trascritto. Poiché l'efficienza della reazione di retrotrascrizione è tanto più alta quanto più è corto il cDNA, gli oligo utilizzati devono mappare in regioni prossimali al 5'-terminale del trascritto. Il primo primer utilizzato è lo stesso che non dava prodotto di amplificazione sull'RNA in **figura 11** (REV7). La banda più intensa visualizzata corrisponde al cDNA più abbondante e quindi probabilmente specifico. In **figura 14** sono mostrati i prodotti di primer extension per 3 oligonucleotidi, che sono stati disegnati per ottenere dei prodotti di retrotrascrizione che si separassero meglio nel gel utilizzato. Il secondo oligo mappa sul genoma a 35 paia di basi a monte dell'oligo REV7, mentre il terzo a 340 paia di basi. Le bande ottenute confermano l'identificazione di unico sito di inizio di trascrizione che si trova a 455 bp di distanza dal REV7.

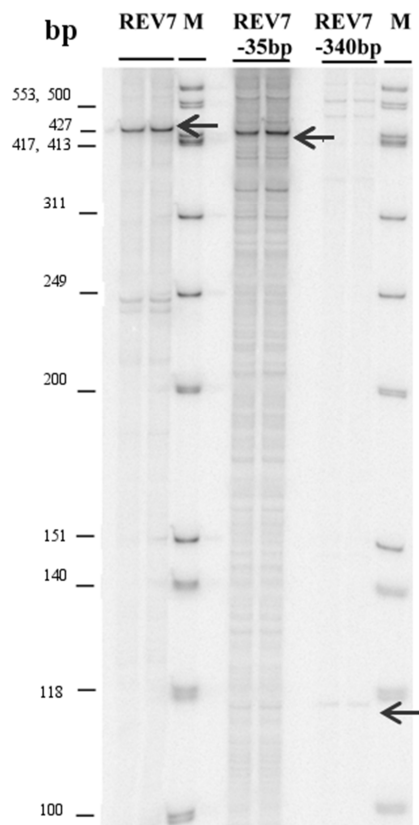


Figura 14. Analisi di primer extension.

IL PROMOTORE GENICO DEL miR-101-1

I risultati ottenuti fanno ipotizzare che il pri-miR-101-1 sia trascritto da una RNA PolII per cui le sequenze regolatrici che agiscono da promotore o sito di riconoscimento da parte di TF sono situate a monte rispetto al punto di inizio della trascrizione. Per l'identificazione delle sequenze promotrici del miR-101-1 sono stati utilizzati saggi di luciferasi. Gli ampliconi ottenuti da DNA di cellule NCM460 e dagli oligonucleotidi in **tabella 7** mappano come in **figura 11(a)**. Sono stati clonati in un plasmide senza sequenze promotrici a monte di un gene reporter della luciferasi. La trasfezione del plasmide in cellule NCM460 permetterà l'espressione della luciferasi con emissione di luminescenza se l'amplicone clonato funge da promotore attivo. In **figura 15** sono mostrati i valori di

luminescenza misurati in funzione del tipo di plasmide clonato. Il plasmide P7 contiene la sequenza promotrice ed il sito di inizio della trascrizione e produce più trascritto per la luciferasi. È da notare che la sequenza dell'amplicone P8 comprende completamente quella corrispondente all'amplicone P7, ma poiché causa una minore attività luciferasi rispetto a quest'ultimo, si ritiene che possa contenere delle sequenze di regolazione trascrizionale negativa.

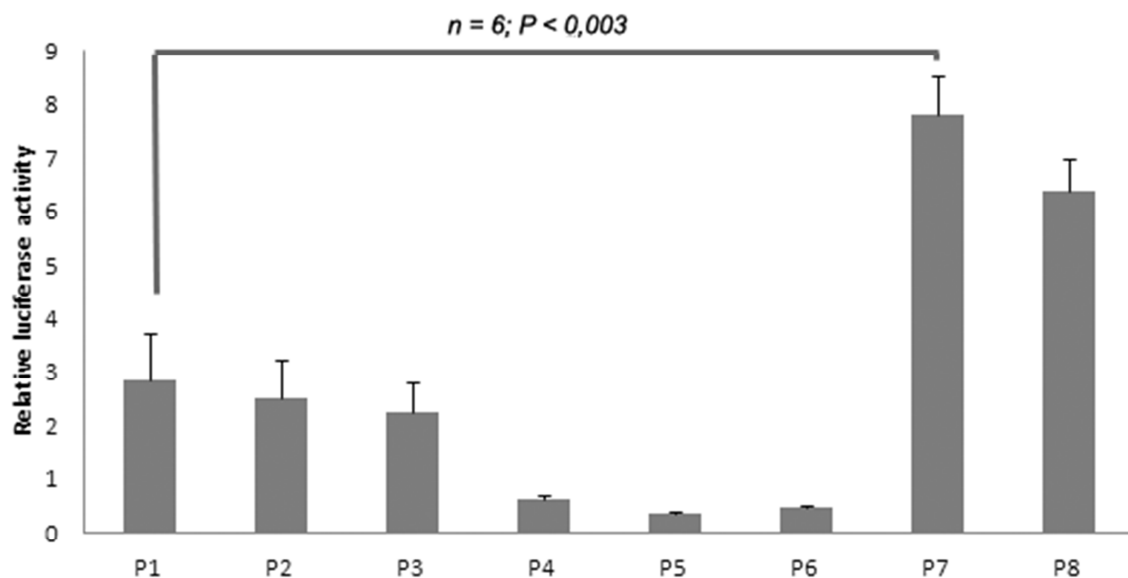


Figura 15. Identificazione della sequenza promotrice del miR-101-1 mediante saggi di luciferasi

IDENTIFICAZIONE DEL TRASCritto PRIMARIO DEL miR-101-2

Il secondo locus genico del miR-101 è sul filamento positivo del cromosoma 9p24 all'interno dell'ottavo introne del gene RCL-1, per cui il pri-miR-101-2 potrebbe coincidere con il trascritto del gene RCL-1 oppure con un trascritto a regolazione indipendente dall'espressione del gene ospite. Sono stati utilizzati 2 approcci per la caratterizzazione del pri-miR-101-2, un saggio di northern blot e un'analisi quantitativa

relativa di espressione. Il saggio di northern blot effettuato include l'utilizzo di una sonda complementare al pre-miR-101-2, che è in grado di riconoscere anche il trascritto primario di RCL1. Nella linea cellulare NCM460 è stato identificato un unico trascritto di lunghezza maggiore di 10 kb (**figura 16(a)**), che esclude la presenza di trascritti più corti come indicato dalle EST nella traccia bioinformatica in **Figura 9**. Poiché tale tipo di approccio prevede il trasferimento delle molecole di RNA dal gel alla membrana, che è ostacolato da molecole ad elevato peso molecolare, non è possibile escludere la presenza di trascritti più lunghi di quello rilevato.

Se il pri-miR-101-2 è trascritto in modo indipendente dai 2 geni di RCL1, allora l'espressione delle regioni prossimali alle rispettive estremità 5' dei 2 geni di RCL1 sarà diversa tra loro e rispetto a quella del trascritto più vicino al miR-101-2. Sono stati quindi disegnati degli oligonucleotidi in regioni introniche prossime al 5' del trascritto lungo di RCL1, di quello corto e di una regione vicina al sito di mappaggio del miR-101-2, rispettivamente indicate in figura come T1, T2 e T3. L'utilizzo di trattamenti cellulari, che provocano una variazione dell'espressione del miR-101 maturo, sono stati effettuati su cellule NCM460. L'RNA cellulare è stato utilizzato per analisi di espressione Real Time-PCR mostrati in **figura 16(b)**. I trattamenti cellulari non apportano un aumento dei livelli di espressione di nessuno dei trascritti ipotizzati. Inoltre la repressione trascrizionale indotta dal lipopolisaccaride (LPS) ed indometacina è correlata tra i diversi ampliconi T1, T2 e T3, per cui non si evidenziano possibilità di regolazione differenziale dei trascritti.

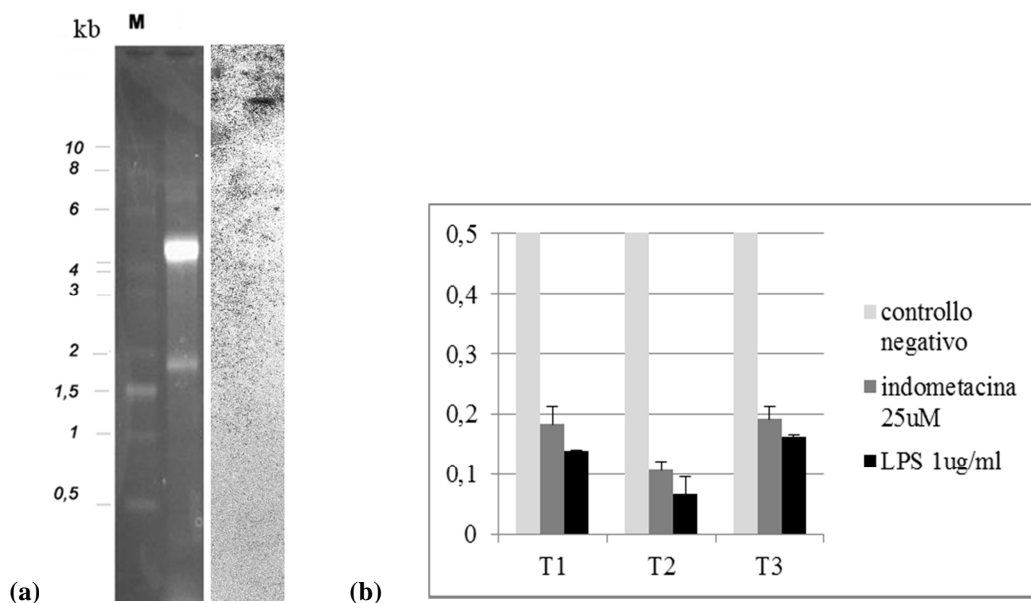


Figura 16. Northern Blot e RealTime PCR per lo studio dei trascritti nella regione genica di RCL1 e miR-101-2.

L'ESPRESSIONE DEL MIR-101 È REGOLATA IN MODO DIRETTO DALLA B-CATENINA

La β -catenina è un fattore di trascrizione (TF) implicato nella via del segnale WNT, la cui attivazione è frequente nell'insorgenza del CRC. Dati di laboratorio riportano una correlazione inversa tra attivazione della β -catenina ed espressione del miR-101. Per caratterizzare tale tipo di regolazione, saggi di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) sono utilizzati per verificare un'interazione tra la regione promotrice del miR-101-1 identificata e il TF. La linea cellulare scelta è quella di coloncarcinoma HCA7, che mostra una forte attivazione della β -catenina. Sono state disegnate delle coppie di primers per amplificare le regioni genomiche regolatrici a monte del sito di inizio della trascrizione del miR-101-1, le regioni promotrici di due geni che dati di letteratura indicano come fortemente attivati dalla β -catenina, gli oncogeni c-Myc e Axin2, e infine una regione non avente attività regolatorie (CN). In **figura 17** sono mostrati i dati ottenuti da tale saggio. Le

regioni genomiche del promotore del miR-101-1 sono arricchite nel campione immunoprecipitato con l'anticorpo (Ab) contro la β -catenina (MIR-1, MIR-3, MIR4) rispetto al controllo CN. Il controllo negativo della reazione di immunoprecipitazione è dato dall'utilizzo di un anticorpo IgG che non è in grado di riconoscere nessun elemento regolatorio umano.

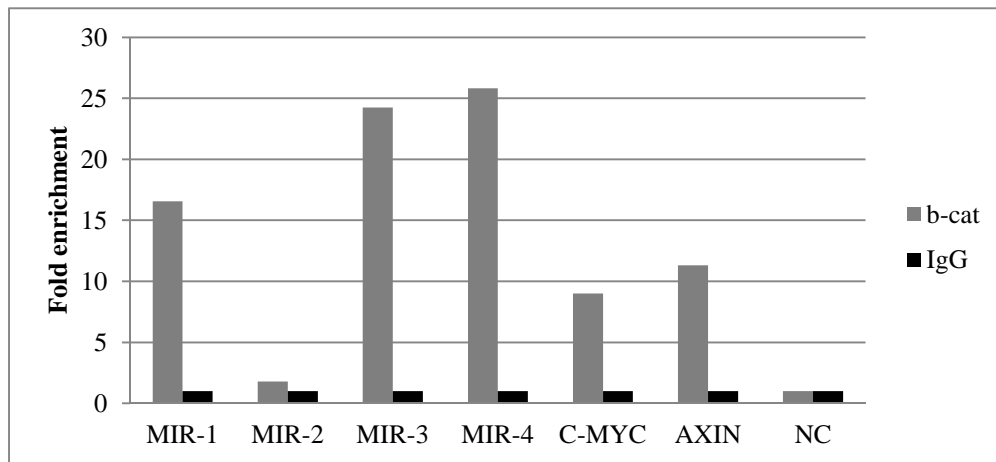


Figura 17. Analisi di arricchimento del campione immunoprecipitato con Ab- β -catenina e anticorpo IgG.

L'ESPRESSIONE DEL MIR-101 È REGOLATA DURANTE L'INFIAMMAZIONE

Si ritiene che l'infiammazione sia un evento chiave nella carcinogenesi colon-rettale. Dati di letteratura indicano che il ruolo del miR-101 negli eventi infiammatori è controverso. Inoltre i FANS, come l'aspirina, sono utilizzati nelle terapie di prevenzione di CRC in pazienti ad elevato rischio. In questo contesto di ricerca, l'attività anti-infiammatoria dell'indometacina, naprossene e aspirina e l'attività pro-infiammatoria dell'LPS sono state valutate sulla regolazione dell'espressione del miR-101 su cellule di coloncarcinoma HCA7. Le cellule trattate sono state raccolte allo scadere delle 6 e 12 ore per un'estrazione di RNA cellulare. I dati di RealTime PCR elaborati (figura 18) mostrano come tutti i

FANS testati sono in grado di regolare positivamente l'espressione del miR-101, seppure in gradi diversi. Invece l'LPS che agisce stimolando una risposta infiammatoria cellulare provoca un dimezzamento dell'espressione del miR-101.

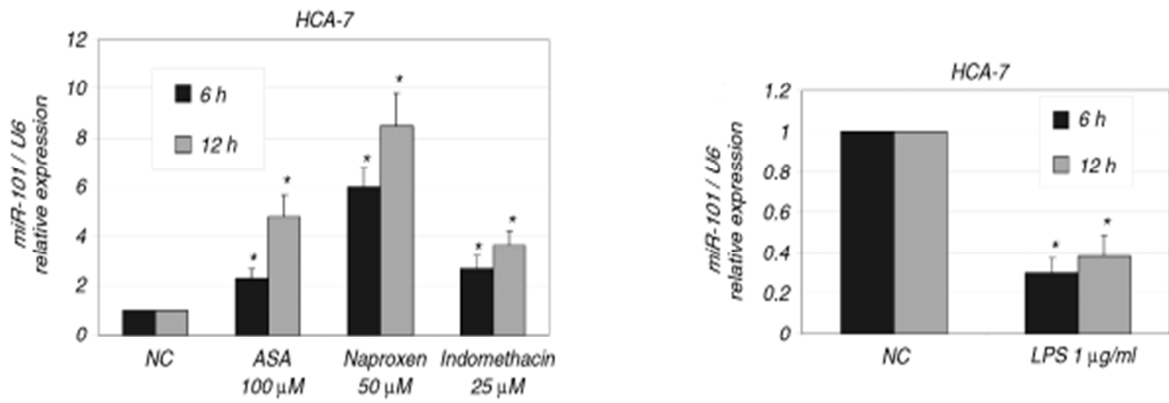


Figura 18. L'espressione del miR-101 è modulata da eventi pro-infiammatori ed anti-infiammatori nelle cellule di coloncarcinoma HCA7.

DISCUSSIONE

Secondo crescenti dati di letteratura il miR-101 è un potente oncosoppressore la cui espressione è fortemente deregolata soprattutto nei tumori solidi del colon-retto, gastrico, tiroideo, polmonare, epatico, pancreatico, al seno e prostatico. Nel 2009 il nostro gruppo di ricerca individua una correlazione inversa nelle linee cellulari di coloncarcinoma e di tessuto CRC tra l'espressione del miR-101 e della COX-2 (Strillacci A et al., 2009; Strillacci et al., 2012). Tale enzima rappresenta un importante target per la terapia del coloncarcinoma, poiché una sua overespressione contribuisce allo sviluppo del fenotipo maligno della cellula tumorale, aumentandone la crescita e l'invasività (Dan A. Dixon et al., 2013). Inoltre la COX-2 agisce producendo prostaglandine, soprattutto PGE2 nelle cellule di colon, ed il miR-101 è in grado di destabilizzare l'mRNA di EP4, il recettore della PGE2 (Chandramouli A et al., 2012). In questo lavoro si è voluta testare l'ipotesi di un meccanismo a feedback in cui il miR-101, che regola l'evento infiammatorio mediante l'inibizione di COX-2 e EP4, possa a sua volta essere regolato in funzione della presenza di uno stimolo infiammatorio. Le cellule di coloncarcinoma HCA7 sono state trattate con stimoli pro-infiammatori (LPS) e anti-infiammatori (aspirina, naprossene, indometacina). La variazione dell'espressione del miR-101 in risposta a tali trattamenti ha confermato la nostra ipotesi, il miR-101 è represso dal trattamento con LPS e stimolato dal trattamento con farmaci antinfiammatori (**Figura 18**). Questi dati evidenziano come il mantenimento di uno stato infiammatorio nel CRC attiva meccanismi di sopravvivenza cellulare che includono la regolazione dell'espressione del miR-101. I FANS, come l'aspirina, sono già utilizzati nelle terapie di prevenzione di CRC in pazienti ad elevato rischio. Altri gruppi di ricerca indicano che una reintegrazione dell'espressione del miR-101 in un contesto tumorale è sufficiente a bloccare le cellule nella fase G1/S del ciclo cellulare, a inibire la

proliferazione, ed indurre apoptosi (He XP et al., 2012; carvalho J et al., 2012; Pushpavalli S et al., 2011); altri invece dimostrano che l'espressione del miR-101 rafforza l'effetto di chemioterapici, come il 4-idrossi-tamoxifene (Frankel LB et al, 2011), e di radioterapie (Chen S et al., 2011). La comprensione dei meccanismi di regolazione dell'espressione del miR-101 potrebbe offrire nuove frontiere allo studio dei meccanismi alla base della cancerogenesi e al trattamento terapeutico e preventivo dei tumori. In questo articolo si muove il primo passo verso la caratterizzazione dei geni del miR-101. Il miR maturo ha infatti 2 loci genici, uno in posizione intergenica e un secondo in un introne di un gene poco noto RCL1. Dati di letteratura mostrano che il trascritto primario di un miRNA può essere lungo da poche centinaia di basi a decine di chilobasi (David L. Corcoran et al., 2009; Fatih Ozsolak et al., 2008) per cui la scelta dell'approccio sperimentale è stata effettuata solo dopo un'analisi di predizione bioinformatica (**Figure 8 e 9**). I primi dati di RT-PCR sul pri-miR-101-1 sono ottenuti utilizzando decine di microgrammi di RNA cellulare, passaggi intermedi di purificazione del prodotto di retrotrascrizione, e tecniche di touchdown PCR (**Figura 10 e 11**). Tali accorgimenti sono stati necessari per confermare la presenza di regioni trascritte nella regione genomica intergenica. L'utilizzo di una tecnica sensibile come il saggio Northern Blot (**Figura 12**) ha permesso di identificare la lunghezza totale del miR-101-1, mentre le tecniche 3'RACE (**Figura 13**) e Primer Extension (**Figura 14**) hanno permesso di mappare tale trascritto sul genoma umano: filamento negativo del cromosoma 1 dalla posizione 65,523,900 e 65,532,204. Il miR-101-2 invece si trova in una sequenza compresa nell'ottavo introne del gene RCL-1. Di questo gene si conoscono 2 trascritti, di cui della forma più breve non è stata identificata la proteina codificata (**Figura 9**). In tale quadro genomico la caratterizzazione di un nuovo gene deve tener conto dei trascritti già noti nella loro forma processata o primaria. L'analisi di Northern Blot ha permesso di escludere l'ipotesi di una presenza di trascritti

contenenti la sequenza del miR-101 più corti di circa 15 kb nel modello cellulare NCM460 (**Figura 16(a)**), mentre l'analisi RealTime-PCR non permette di predire la presenza di trascritti con diversa variazione dell'espressione in seguito a trattamento con indometacina e LPS (**Figura 16(b)**). Da tale analisi resta il quesito di una possibile regolazione dell'espressione del miR-101-2 dipendente dal promotore del gene RCL-1. Nel coloncarcinoma la via del segnale WNT è spesso attivata da mutazioni del gene APC e promuove l'attivazione del fattore trascrizionale β -catenina che, migrando nel nucleo, attiva la trascrizione di numerosi oncogeni come c-Myc e Axin2. Tale evento si ritiene sia uno dei primi eventi nello sviluppo di un tumore colon-rettale (Ajay e Boland, 2012). Nel nostro laboratorio è stata osservata una regolazione inversa tra l'espressione del miR-101 e l'attivazione della β -catenina (Strillacci A et al, 2012). In questo lavoro, in seguito all'identificazione delle sequenze promotorie del miR-101-1, è stato possibile identificare un meccanismo diretto di regolazione della β -catenina sul promotore del miR-101-1 (**Figura 17**).

CONCLUSIONI

Questo lavoro si pone all'inizio degli studi di regolazione dell'espressione del miR-101, poiché ne individua per la prima volta le caratteristiche geniche, almeno per il miR-101-1. Nell'ambito del cancro colon-rettale si conferma il coinvolgimento del miR-101 in due eventi chiave nella tumorigenesi colon-rettale: attivazione del segnale WNT/ β -catenina e microambiente infiammatorio. Nel primo evento, sulla base del lavoro Strillacci et al. (2012), si è individuata una regolazione diretta della β -catenina sul gene miR-101-1. Nel contesto infiammatorio è stato anche proposto un modello di regolazione dell'espressione del miR-101 in cui agenti pro-infiammatori (LPS) sono in grado di reprimere l'espressione del miR, viceversa gli agenti anti-infiammatori (FANS).

BIBLIOGRAFIA

- Ahnen DJ. (2011). The american college of gastroenterology emily couric lecture--the adenoma-carcinoma sequence revisited: Has the era of genetic tailoring finally arrived? *Am J Gastroenterol.* 106:190–198.
- Ajay Goel e C. Richard Boland, (2012). Epigenetics of Colorectal Cancer. *GASTROENTEROLOGY* 143:1442–1460.
- Allemand E, Guil S, Myers M, Moscat J, Caceres JF, Krainer A (2005). Regulation of heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1 transport by phosphorylation in cells stressed by osmotic shock. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:3605-3610.
- Ana Eulalio, Eric Huntzinger, and Elisa Izaurralde (2008). Getting to the Root of miRNA-Mediated Gene Silencing. *Cell* 132.
- Anthony K. L. Leung, Phillip A. Sharp, (2013). Quantifying Argonaute Proteins In and Out of GW/P-Bodies: Implications in microRNA Activities. *Advances in Experimental Medicine and Biology* Volume 768, pp 165-182.
- Asuka Azuma-Mukai, Hideo Oguri, Toutai Mituyama, Zhi Rong Qian, Kiyoshi Asai, Haruhiko Siomi, and Mikiko C. Siomi. (2008). Characterization of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 7964–7969.
- Bannister AJ, Kouzarides T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 21:381–395
- Bar M, Wyman SK, Fritz BR, Qi J, Garg KS, Parkin RK, Kroh EM, Bendoraitis A, Mitchell PS, Nelson AM, Ruzzo WL, Ware C, Radich JP, Gentleman R, Ruohola-Baker H, Tewari M. (2008). MicroRNA discovery and profiling in human embryonic stem cells by deep sequencing of small RNA libraries. *Stem Cells.* 26(10):2496-505.
- Ben-Ami O, Pencovich N, Lotem J, Levanon D, Groner Y (2009). A regulatory interplay between miR-27a and Runx1 during megakaryopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:238-243.
- Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 10: 185–191.
- Brandi N Davis and Akiko Hata (2009). Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. *Cell Communication and Signaling*, 7:18.
- Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, Shimizu M, Cimmino A, Zupu S, Dono M, (2004a) MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:11755-11760

- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, (2004b) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:2999-3004.
- Carpenter B, MacKay C, Alnabulsi A, MacKay M, Telfer C, Melvin WT, Murray GI (2006). The roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in tumour development and progression. *Biochim Biophys Acta* 1765:85-100.
- Carvalho J, van Grieken NC, Pereira PM, Sousa S, Tijssen M, Buffart TE, Diosdado B, Grabsch H, Santos MA, Meijer G, Seruca R, Carvalho B, Oliveira C. (2012). Lack of microRNA-101 causes E-cadherin functional deregulation through EZH2 up-regulation in intestinal gastric cancer. *J Pathol.* 228(1):31-44.
- Chandramouli A, Onyeagucha BC, Mercado-Pimentel ME, Stankova L, Shahin NA, LaFleur BJ, Heimark RL, Bhattacharyya AK, Nelson MA. (2012). MicroRNA-101 (miR-101) post-transcriptionally regulates the expression of EP4 receptor in colon cancers. *Cancer Biol Ther.* 13(3):175-83.
- Chao-Wei Chiang, Yi Huang, Ka-Wai Leong, Lih-Chyang Chen, Hua-Chien Chen, Shu-Jen Chen, Chen-Kung Chou (2010). PKC α mediated induction of miR-101 in human hepatoma HepG2 cells. *Journal of Biomedical Science* 17:35.
- Chen K, Fan W, Wang X, Ke X, Wu G, Hu C.(2012). MicroRNA-101 mediates the suppressive effect of laminar shear stress on mTOR expression in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.*427(1):138-42.
- Chen S, Wang H, Ng WL, Curran WJ, Wang Y. (2011). Radiosensitizing effects of ectopic miR-101 on non-small-cell lung cancer cells depend on the endogenous miR-101 level. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 81(5):1524-9.
- Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY. (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.*18(10):997-1006.
- Cho HM, Jeon HS, Lee SY, Jeong KJ, Park SY, Lee HY, Lee JU, Kim JH, Kwon SJ, Choi E, Na MJ, Kang J, Son JW.(2011). microRNA-101 inhibits lung cancer invasion through the regulation of enhancer of zeste homolog 2. *Exp Ther Med.* 2(5):963-967.
- .
- Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. (2011). MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol.* 8(8):467-77.

- Dan A. Dixon, Fernando F. Blanco, Annalisa Bruno, e Paola Patrignani (2013). Mechanistic Aspects of COX-2 Expression in Colorectal Neoplasia. *Recent Results Cancer Res.*191: 7–37.
- Daniel Cifuentes, Huiling Xue, David W. Taylor, Heather Patnode, Yuichiro Mishima (2010). A Novel miRNA Processing Pathway Independent of Dicer Requires Argonaute2 Catalytic Activity. *Science* 328:1694-1698.
- David L. Corcoran, Kusum V. Pandit, Ben Gordon, Arindam Bhattacharjee, Naftali Kaminski, Panayiotis V. Benos (2009). Features of Mammalian microRNA Promoters Emerge from Polymerase II Chromatin Immunoprecipitation. *PLoS ONE* 4 :e5279
- De Leo, Fasano, Ginelli, *Biologia e Genetica* II Ed., EdiSES
- Donal O’Carroll and Anne Schaefer (2013). General Principles of miRNA Biogenesis and Regulation in the Brain. *Neuropsychopharmacology* 38:39–54.
- Edenir Inês Palmero, Silvana Gisele P de Campos, Marcelo Campos, Naiara C Nogueira de Souza, Ismael Dale C. Guerreiro, Andre L. Carvalho and Marcia Maria C. Marques, (2011). Mechanisms and role of microRNA deregulation in cancer onset and progression. *Genetics and Molecular Biology*, 34, 3, 363-370.
- Faller, M., Matsunaga, M., Yin, S., Loo, J. A. & Guo, F (2007). Heme is involved in microRNA processing. *Nature Struct. Mol. Biol.* 14, 23–29.
- Fatih Ozsolak, Laura L. Poling, Zhengxin Wang, Hui Liu, X. Shirley Liu, Robert G. Roeder, Xinmin Zhang, Jun S. Song and David E. Fisher (2008). Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Gene & development* 22: 3172–3183.
- Feinberg AP, Gehrke CW, Kuo KC, et al. (1988). Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia. *Cancer Res*;48:1159–1161.
- Forman, J. J., Legesse-Miller, A. & Coller, H. A. (2008). A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105,14879–14884.
- Frankel LB, Wen J, Lees M, Høyer-Hansen M, Farkas T, Krogh A, Jäättelä M, Lund AH. (2011). microRNA-101 is a potent inhibitor of autophagy. *EMBO J.* 30(22):4628-41.
- Gianpiero Di Leva e Carlo M Croce, (2013). miRNA profiling of cancer. *Current Opinion in Genetics & Development* 2013, 23:1–9.
- Goelz SE, Vogelstein B, Hamilton SR, et al. (1985). Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. *Science* 228:187–190.
- Guenther M.G., Levine S.S., Boyer L.A., Jaenisch R., Young R.A. (2007). A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell.*130:77–88.

- Han J, Pedersen JS, Kwon SC, Belair CD, Kim YK, Yeom KH, Yang WY, Haussler D, Blelloch R, Kim VN (2009). Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8. *Cell* 136, 75–84.
- Han L., Witmer, P. D., Casey, E., Valle, D. & Sukumar, S. (2007). DNA methylation regulates microRNA expression. *Cancer Biol. Ther.* 6, 1284–1288.
- Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, Sohn SY, Cho Y, Zhang BT, Kim VN (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*.125(5):887-901.
- Hao Y, Gu X, Zhao Y, Greene S, Sha W, Smoot DT, Califano J, Wu TC, Pang X. (2011). Enforced expression of miR-101 inhibits prostate cancer cell growth by modulating the COX-2 pathway in vivo. *Cancer Prev Res (Phila)*. 4(7):1073-83.
- Hassan F, Nuovo GJ, Crawford M, Boyaka PN, Kirkby S, Nana-Sinkam SP, Cormet Boyaka E. (2012). MiR-101 and miR-144 regulate the expression of the CFTR chloride channel in the lung. *PLoS One*. 7(11):e50837
- He XP, Shao Y, Li XL, Xu W, Chen GS, Sun HH, Xu HC, Xu X, Tang D, Zheng XF, Xue YP, Huang GC, Sun WH. (2012). Downregulation of miR-101 in gastric cancer correlates with cyclooxygenase-2 overexpression and tumor growth. *FEBS J*. 279(22):4201-12.
- Heintzman N.D., Stuart R.K., Hon G., Fu Y., Ching C.W., Hawkins R.D., Barrera L.O., Van Calcar S., Qu C., Ching K.A., (2007) Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat. Genet.* 39:311–318.
- Henke JI, Goergen D, Zheng J, Song Y, Schuttler CG, Fehr C et al (2008). microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J* 27: 3300–3310.
- Hitchins MP, Wong JJ, Suthers G, et al. (2007). Inheritance of a cancer-associated MLH1 germ-line epimutation. *N Engl J Med* 356:697–705.
- Jacek Krol, Inga Loedige and Witold Filipowicz (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics* 11, 597-610
- Jeffrey M. Friedman, Gangning Liang, and Peter A. Jones (2009). The tumor suppressor microRNA-101 becomes an epigenetic player by targeting the Polycomb group protein EZH2 in cancer. *Cell Cycle*. 8(15): 2313–2314.
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D and Slack FJ (2005) RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 120:635-647.
- Johnston, M., Geoffroy, M. C., Sobala, A., Hay, R. & Hutvagner, (2010).G. HSP90 protein stabilizes unloaded argonaute complexes and microscopic P-bodies in human cells. *Mol. Biol. Cell* 21, 1462–1469.

- Jr-Shiuan Yang, Thomas Maurin, and Eric C. Lai (2012). Functional parameters of Dicer-independent microRNA biogenesis. *RNA* 18(5): 945–957.
- Julia Starega-Roslan, Edyta Koscianska, Piotr Kozlowski, Włodzimierz J. Krzyzosiak (2011). The role of the precursor structure in the biogenesis of microRNA, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68:2859–2871.
- Kawahara Yukio, Boris Zinshteyn, Praveen Sethupathy, Hisashi Iizasa, Artemis G. Hatzigeorgiou, Kazuko Nishikura, (2007). Redirection of silencing targets by adenosine-to-inosine editing of miRNAs. *Science* 315, 1137–1140.
- Kottakis F, Polytarchou C, Foltopoulou P, Sanidas I, Kampranis SC, Tsihchlis PN. (2011). FGF-2 regulates cell proliferation, migration, and angiogenesis through an NDY1/KDM2B-miR-101-EZH2 pathway. *Mol Cell*. 43(2):285-98.
- Kouzarides T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128:693–705.
- Krol, J., Busskamp, V., Markiewicz, I., Stadler, M. B., Ribi, S., Richter, J., Duebel, J., Bicker, S., Fehling, H. J., Schubeler, D., Oertner, T. G., Schratt, G., Bibel, M., Roska, B., Filipowicz, W. (2010). Characterizing light-regulated retinal microRNAs reveals rapid turnover as a common property of neuronal microRNAs. *Cell* 141: 618-631.
- Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, Garzon R, Alder H, Agosto-Perez FJ, Davuluri R, Liu CG, Croce CM, Negrini M, Calin GA, Ivan M. (2007) A microRNA signature of hypoxia. *Mol Cell Biol*. 27(5):1859-67.
- Kunej T, Godnic I, Ferdin J, Horvat S, Dovc P, Calin GA. (2011). Epigenetic regulation of microRNAs in cancer: an integrated review of literature. *Mutat Res*. 717(1-2):77-84.
- Kunej Tanja, Godnic Irena, Horvat Simon, Zorc Minja, Calin George A. (2012). Talk Between MicroRNA and Coding Cancer Genes. *Cancer Journal* Volume 18 - Issue 3 - p 223–231.
- Landgraf P., Rusu M., Sheridan R., Sewer A., Iovino N., Aravin A., Pfeffer S., Rice A., Kamphorst A.O., Landthaler M., et al. (2007). A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*.129:1401–1414.
- Lee EJ, Baek M, Gusev Y, Brackett DJ, Nuovo GJ, Schmittgen TD (2008). Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors. *RNA*, 14:35-42.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75(5):843-54.
- Linghui Dai, Xin Zhang, Xiaoqing Hu, Chunyan Zhou and Yingfang A. (2012). Silencing of microRNA-101 prevents IL-1 β - induced extracellular matrix degradation in chondrocytes. *Arthritis Research & Therapy* 14:R268.
- Liu X, He M, Hou Y, Liang B, Zhao L, Ma S, Yu Y, Liu X. (2013). Expression profiles of microRNAs and their target genes in papillary thyroid carcinoma. *Oncol Rep*. 29(4):1415-20.

- Llorens F, Bañez-Coronel M, Pantano L, Del Río JA, Ferrer I, Estivill X, Martí E. (2013). A highly expressed miR-101 isomiR is a functional silencing small RNA. *BMC Genomics* 14:104.
- Long JM, Lahiri DK. (2011). MicroRNA-101 downregulates Alzheimer's amyloid- β precursor protein levels in human cell cultures and is differentially expressed. *Biochem Biophys Res Commun.* 404(4):889-95.
- Luo L, Zhang T, Liu H, Lv T, Yuan D, Yao Y, Lv Y, Song Y. (2012). MiR-101 and Mcl-1 in non-small-cell lung cancer: expression profile and clinical significance. *Med Oncol.*29(3):1681-6.
- Lewin B, Krebs JE, Goldstrin ES, Kilpatrick ST (2010). *Il gene X*, Zanichelli Editore.
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435:834-838.
- Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. (2007). Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 104:9667–9672.
- Marc Robert Fabian, Nahum Sonenberg, and Witold Filipowicz, (2010). Regulation of mRNA. Translation and Stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem.* 79:351-79.
- Mark M.W. Chong, Guoan Zhang, Sihem Cheloufi, Thomas A. Neubert, Gregory J. Hannon and Dan R. Littman (2010). Canonical and alternate functions of the microRNA biogenesis machinery. *Genes & Development* 24:1951–1960
- Martin A. Newman and Scott M. Hammond (2010). Emerging paradigms of regulated microRNA processing. *Genes & Dev.* 24: 1086-1092.
- Michlewski G, Guil S, Semple CA, Cáceres JF (2008). Posttranscriptional regulation of miRNAs harboring conserved terminal loops. *Mol Cell* 32(3):383-93.
- Monica Ballarino, Francesca Pagano, Erika Girardi, Mariangela Morlando, Davide Cacchiarelli, Marcella Marchioni, Nicholas J. Proudfoot, and Irene Bozzoni (2009). Coupled RNA Processing and Transcription of Intergenic Primary MicroRNAs. *Molecular and Cellular Biology* p. 5632–5638.
- Moreno Colaiacovo, Antonella Lamontanara, Letizia Bernardo, Renzo Alberici, Cristina Crosatti, Lorenzo Giusti, Luigi Cattivelli and Primetta Faccioli (2012). On the complexity of miRNA-mediated regulation in plants: novel insights into the genomic organization of plant miRNAs. *Biology Direct* 7:1745-6150.
- Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G (2002). miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev.* 16(6):720-8.
- Ng EK, Chong WW, Jin H, Lam EK, Shin VY, Yu J, Poon TC, Ng SS, Sung JJ. (2009). Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut.* (10):1375-81.

- Ogino S, Cantor M, Kawasaki T, et al. (2006). CpG island methylator phenotype (CIMP) of colorectal cancer is best characterised by quantitative DNA methylation analysis and prospective cohort studies. *Gut* 55:1000–1006.
- Omer Barad, Mati Mann, Elik Chapnik, Archana Shenoy, Robert Blelloch, Naama Barkai e Eran Hornstein (2012). Efficiency and specificity in microRNA biogenesis. *Nature structural & molecular biology* 19(6):650-2
- Orom UA, Nielsen FC, Lund AH (2008). MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell* 30: 460–471.
- Ozsolak F., Song J.S., Liu X.S., Fisher D.E. (2007). High-throughput mapping of the chromatin structure of human promoters. *Nat. Biotechnol.* 25:244–248.
- Pan Z, Sun X, Shan H, Wang N, Wang J, Ren J, Feng S, Xie L, Lu C, Yuan Y, Zhang Y, Wang Y, Lu Y, Yang B. (2012). MicroRNA-101 inhibited postinfarct cardiac fibrosis and improved left ventricular compliance via the FBJ osteosarcoma oncogene/transforming growth factor- β 1 pathway. *Circulation.* 14:126(7).
- Paroo, Z., Ye, X., Chen, S. & Liu, Q. (2009). Phosphorylation of the human microRNA-generating complex mediates MAPK/Erk signaling. *Cell* 139, 112–122.
- Paul Cao, Zhiyong Deng, Meimei Wan, Weiwei Huang, Scott D Cramer, Jianfeng Xu, Ming Lei, Guangchao Sui (2010). MicroRNA-101 negatively regulates Ezh2 and its expression is modulated by androgen receptor and HIF-1 α /HIF-1. *Molecular Cancer* 2010, 9:108.
- Pushpavalli S, Ramaiah MJ, Srinivas Ch, Mukhopadhy D, Aditya J, Kumbhare RM, Bhadra U, Bhadra MP. (2011). Effect of Benzothiazole based conjugates in causing apoptosis by Regulating p53, PTEN and MAP Kinase proteins affecting miR-195a and miR-101-1. *Cancer Cell Int.* 11:36.
- Qazi AM, Gruzdyn O, Semaan A, Seward S, Chamala S, Dhulipala V, Sethi S, Ali-Fehmi R, Philip PA, Bouwman DL, Weaver DW, Gruber SA, Batchu RB. (2012). Restoration of E-cadherin expression in pancreatic ductal adenocarcinoma treated with microRNA-101. *Surgery.* 152(4):704-11.
- Ruby JG, Jan CH, Bartel DP (2007). Nature Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 448(7149):83-6.
- Ruqiang Liang, David J. Bates and Eugenia Wang (2009). Epigenetic Control of MicroRNA Expression and Aging. *Current Genomics*, 10:184-193.
- Sankala, H., Zhang, X. & Graves, P. R., (2008). Phosphorylation of Argonaute 2 at serine-387 facilitates its localization to processing bodies. *Biochem. J.* 413, 429–436.
- Sakurai T, Bilim VN, Ugolkov AV, Yuuki K, Tsukigi M, Motoyama T, Tomita Y. (2012). The enhancer of zeste homolog 2 (EZH2), a potential therapeutic target, is regulated by miR-101 in renal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 422(4):607-14.

- Scadden AD., (2005). The RISC subunit Tudor-SN binds to hyper-edited double-stranded RNA and promotes its cleavage. *Nature Struct. Mol. Biol.* 12, 489–496.
- Schaefer JS, Montufar-Solis D, Vigneswaran N, Klein JR (2011). Selective upregulation of microRNA expression in peripheral blood leukocytes in IL-10^{-/-} mice precedes expression in the colon. *J Immunol.* 187(11):5834-41.
- Schee K, Boye K, Abrahamsen TW, Fodstad Ø, Flatmark K. (2012). Clinical relevance of microRNA miR-21, miR-31, miR-92a, miR-101, miR-106a and miR-145 in colorectal cancer. *BMC Cancer.* 12:505
- Sebastien Haiart, David I Watson, Mary P Leong, David Astill, Tim Bright, Damian J Hussey (2011). MicroRNA-196a & microRNA-101 expression in Barrett's oesophagus in patients with medically and surgically treated gastro-oesophageal reflux. *BMC Res Notes.* 4: 41.
- Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, Ambros V (2004). 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.
- Seungil Ro, Chanjae Park, David Young, Kenton M. Sanders and Wei Yan, (2007). Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic Acids Research,* 35(17): 5944–5953
- Shalgi R, Lieber D, Oren M, Pilpel Y (2007). Global and local architecture of the mammalian microRNA-transcription factor regulatory network. *PLoS Comput Biol,* 3:e131.
- Shimada N, Rios I, Moran H, Sayers B, Hubbard K (2009). p38 MAP kinase-dependent regulation of the expression level and subcellular distribution of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and its involvement in cellular senescence in normal human fibroblasts. *RNA Biol.* 6(3):293-304
- Sihem Cheloufi, Camila O. Dos Santos, Mark M. W. Chong, and Gregory J. Hannon (2010). A Dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* 465(7298): 584–589.
- Starega-Roslan J, Krol J, Koscianska E, Kozlowski P, Szlachcic WJ, Sobczak K, Krzyzosiak WJ. (2011). Structural basis of microRNA length variety. *Nucleic Acids Res.* 39(1):257-68.
- Stoecklin G, Kedersha N., (2013). Relationship of GW/P-bodies with stress granules. *Adv Exp Med Biol.* 768:197-211. Shen G, Li X, Jia YF, Piazza GA, Xi Y. Hypoxia-regulated microRNAs in human cancer. *Acta Pharmacol Sin.* 34(3):336-4.
- Strillacci A, Griffoni C, Sansone P, Paterini P, Piazza G, Lazzarini G, Spisni E, Pantaleo MA, Biasco G, Tomasi V. (2009). MiR-101 downregulation is involved in cyclooxygenase-2 overexpression in human colon cancer cells. *Exp Cell Res.* 315(8):1439-47.
- Strillacci A, Valerii MC, Sansone P, Caggiano C, Sgromo A, Vittori L, Fiorentino M, Poggioli G, Rizzello F, Campieri M, Spisni E. (2013). Loss of miR-101 expression promotes Wnt/β-

- catenin signalling pathway activation and malignancy in colon cancer cells. *J Pathol.* 229(3):379-89.
- Varambally S, Cao Q, Mani RS, Shankar S, Wang X, Ateeq B, Laxman B, Cao X, Jing X, Ramnarayanan K, Brenner JC, Yu J, Kim JH, Han B, Tan P, Kumar-Sinha C, Lonigro RJ, Palanisamy N, Maher CA, Chinnaiyan AM. (2008). Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. *Science* 322(5908):1695-9.
- Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318: 1931–1934.
- Vera Huang and Long-Cheng Li, (2012). miRNA goes nuclear. *RNA Biology* 9:3, 1–5
- Vilaro E, Barbato C, Ciotti M, Cogoni C, Ruberti F. (2010). MicroRNA-101 regulates amyloid precursor protein expression in hippocampal neurons. *J Biol Chem.* 285(24):18344-51.
- Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci* 103(7):2257-61.
- Wang FZ, Weber F, Croce C, Liu CG, Liao X, Pellett PE. (2008). Human cytomegalovirus infection alters the expression of cellular microRNA species that affect its replication. *J Virol.* 82(18):9065-74.
- Wang HJ, Ruan HJ, He XJ, Ma YY, Jiang XT, Xia YJ, Ye ZY, Tao HQ (2010). MicroRNA-101 is down-regulated in gastric cancer and involved in cell migration and invasion. *Eur J Cancer.*
- Wang R, Wang HB, Hao CJ, Cui Y, Han XC, Hu Y, Li FF, Xia HF, Ma X. (2012). MiR-101 is involved in human breast carcinogenesis by targeting Stathmin1. *PLoS One.* 7(10):e46173.
- Wei X, Xiang T, Ren G, Tan C, Liu R, Xu X, Wu Z. (2013). miR-101 is down-regulated by the hepatitis B virus x protein and induces aberrant DNA methylation by targeting DNA methyltransferase 3A. *Cell Signal.* 25(2):439-46.
- Worthley DL, Whitehall VL, Buttenshaw RL, et al (2010). DNA methylation within the normal colorectal mucosa is associated with pathway-specific predisposition to cancer. *Oncogene.*
- Wu, L., Fan, J. & Belasco, J. G. (2008). Importance of translation and nonnucleolytic ago proteins for on-target RNA interference. *Curr. Biol.* 18, 1327–1332.
- Xuezhong Cai, Curt H. Hagedorn and Bryan R. Cullen (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10: 1957-1966.
- Xuhang Liu, Dong-Yan Jin, Michael T. McManus, and Zissimos Mourelatos (2012). Precursor MicroRNA-Programmed Silencing Complex Assembly Pathways in Mammals. *Molecular Cell* 46, 507–517.

- Yang J, Lu YW, Lu MM, Leng RX, Pan HF, Ye DQ. (2013). MicroRNA-101, mitogen-activated protein kinases and mitogen-activated protein kinases phosphatase-1 in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 22(2):115-20
- Yong Zhao and Deepak Srivastava (2007). A developmental view of microRNA function. *Trends Biochem Sci*. 32: 189–197.
- Yoosik Kim and V. Narry Kim (2012). MicroRNA Factory: RISC Assembly from Precursor MicroRNAs, *Molecular Cell* 46.
- Yu D, Tan AH, Hu X, Athanasopoulos V, Simpson N, Silva DG, Hutloff A, Giles KM, Leedman PJ, Lam KP, Goodnow CC, Vinuesa CG. (2007). Roquin represses autoimmunity by limiting inducible Tcell co-stimulator messenger RNA. *Nature*. 450:299–303.
- Zhang Y, Guo X, Xiong L, Kong X, Xu Y, Liu C, Zou L, Li Z, Zhao J, Lin N. (2012). MicroRNA-101 suppresses SOX9-dependent tumorigenicity and promotes favorable prognosis of human hepatocellular carcinoma. *FEBS Lett*. 586(24):4362-70.