



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

**DOTTORATO IN BIOLOGIA, GENETICA UMANA E
BIOINFORMATICA: BASI CELLULARI E MOLECOLARI DEL
FENOTIPO-XXII CICLO**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE

SEZIONE DI BIOLOGIA GENERALE, BIOLOGIA CELLULARE, GENETICA MOLECOLARE
G.SICHEL

UNITÀ DI BIOMEDICINA MOLECOLARE GENOMICA E DEI SISTEMI COMPLESSI,
GENETICA, BIOLOGIA COMPUTAZIONALE

Dott.ssa Alessandra Majorana

**ALTERAZIONI SPECIFICHE DEL TRASCRIPTOMA DEI
MICRORNA E STRUTTURA GLOBALE DELLA
NETWORK IN CARCINOMA COLORETTALE DOPO
TRATTAMENTO CON CETUXIMAB**

Tesi di Dottorato

Coordinatore e Tutor:
Chiar.mo Prof. MICHELE PURRELLO

Anno Accademico 2009 – 2010

INDICE

RIASSUNTO	pag.1
1. INTRODUZIONE	pag.4
1.1 CLASSIFICAZIONE ED EPIDEMIOLOGIA DEL CARCINOMA DEL COLON-RETTO.....	pag.4
1.2.1 ALTERAZIONI GENETICHE CLASSICHE ASSOCIATE AL CRC.....	pag.9
1.2.2 ALTRE ALTERAZIONI GENETICHE.....	pag.12
1.3.1 PREVENZIONE E DIAGNOSI.....	pag.14
1.3.2 TEST DIAGNOSTICI.....	pag.15
1.4.1 TARGETS MOLECOLARI E TRATTAMENTO DEL CARCINOMA COLO-RETTALE.....	pag.16
1.4.2 TERAPIA ANTI-EGFR: CETUXIMAB PANITUMUMAB.....	pag.18
1.4.3 MECCANISMI MOLECOLARI DI RESISTENZA ALLA TERAPIA ANTI-EGFR.....	pag.22
1.5.1. MICRORNA.....	pag.24
1.5.2 ORGANIZZAZIONE DEI MICRORNA NEL GENOMA UMANO.....	pag.25
1.5.3 BIOGENESI DEI MICRORNA.....	pag.27
1.5.4 REGOLAZIONE POST-TRASCRIZIONALE MEDIATA DAI MICRORNA.....	pag.31

1.5.5 REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEI MICRORNA....	pag.34
1.6.1 MICRORNA E TUMORI.....	pag.36
1.6.2 MICRORNA COINVOLTI NEL CARCINOMA DEL COLON-RETTO.....	pag.39
1.6.3 MICRORNA CIRCOLANTI NEL PLASMA.....	pag.43
1.6.4 SILENZIAMENTO E RIPRISTINO DEI MICRORNA:UN FUTURO APPROCCIO TERAPEUTICO?.....	pag.45
1.7 SYSTEMS BIOLOGY.....	pag.46
2. MATERIALI E METODI.....	pag.58
2.1 COLTURE CELLULARI.....	pag.58
2.2 ANALISI DELLA VITALITÀ CELLULARE DOPO TRATTAMENTO CON CETUXIMAB E PANITUMUMAB.....	pag.58
2.3 TRATTAMENTO FARMACOLOGICO CON CETUXIMAB.....	pag.60
2.4 CAMPIONI DI TESSUTO PARAFFINATO.....	pag.61
2.5 REAL TIME PCR.....	pag.62
2.5.1 QUANTIFICAZIONE MEDIANTE SAGGIO TAQMAN.....	pag.64
2.6 ANALISI DEL TRASCRITTOMA DEI MICRORNA IN LINEE CRC MEDIANTE TAQMAN® HUMAN MICRORNA ARRAY.....	pag.66
2.7 ANALISI DEI DATI DI ESPRESSIONE.....	pag.70

2.8 DETERMINAZIONE DELLA MUTAZIONI DI KRAS E ANALISI DI ESPRESSIONE DEI MICRORNA IN CAMPIONI PARAFFINATI DI PAZIENTI CRC	pag.71
2.9 PREDIZIONE DEI TARGETS E ANALISI DELLE GENE ONTOLOGIES.....	pag.73
2.10 ANALISI GENOMICA COMPUTAZIONALE.....	pag.74
2.11 ANALISI DELLE NETWORK.....	pag.75
3. RISULTATI	pag.77
3.1 DIFFERENTE SENSIBILITA' DELLE CELLULE DI ADENOCARCINOMA AL COLON AL CETUXIMAB E AL PANITUMUMAB.....	pag.77
3.2 ESPRESSIONE DEI MICRORNA IN LINEE CELLULARI CRC DOPO TRATTAMENTO AL CETUXIMAB	pag.78
3.3 CORRELAZIONE TRA MUTAZIONI DI KRAS E ESPRESSIONE DEI MICRORNA IN CAMPIONI CRC PARAFFINATI.....	pag.85
3.4 REGOLAZIONE DELLE FAMIGLIE DI MICRORNA E DEI CLUSTERS GENOMICI.....	pag.87
3.5 IDENTIFICAZIONE DI TFBS PER MICRORNA COREGOLATI	pag.89
3.6 ANALISI DEI TARGETS.....	pag.92
3.7 NETWORK E GENE ONTOLOGIES DEI TARGETS.....	pag.95
4. DISCUSSIONE.....	pag.101
5. CONCLUSIONI.....	pag.108
BIBLIOGRAFIA.....	pag.110

1. INTRODUZIONE

1.1 CLASSIFICAZIONE ED EPIDEMIOLOGIA DEL CARCINOMA DEL COLON-RETTO

Il carcinoma del colon-retto (CRC) è la terza forma tumorale per frequenza e la seconda causa di morte per neoplasia in molti Paesi occidentali. Esso rappresenta il terzo tumore maligno per incidenza e mortalità, dopo quello della mammella nella donna, della prostata nell'uomo e del polmone per entrambi i sessi. E' la più comune neoplasia dei paesi sviluppati ed è responsabile di circa il 10% dei decessi per tumore maligno (1). Si manifesta a tutte le età, ma è più colpita la sesta e la settima decade. Pur colpendo maggiormente il sesso maschile, interessa i due sessi quasi con la medesima frequenza. In Italia, in particolare, il tumore al colon-retto è la quarta forma di neoplasia più comune per incidenza negli uomini con circa 20 mila nuovi casi annui e la terza nelle donne con 17 mila nuovi casi annui. Inoltre è la seconda causa di mortalità per tumore in entrambi i sessi (dati AIRT, Associazione Italiana registri Tumori).

Il CRC è una malattia eterogenea, caratterizzata da numerose alterazioni genetiche ed epigenetiche. Queste alterazioni genetiche, quando ereditate e presenti in tutte le cellule dell'organismo, predispongono all'insorgenza dei CRC ereditari. Molto più frequentemente però, sono i fattori ambientali che,

nel corso della vita di un individuo, alterano direttamente il DNA delle cellule epiteliali della mucosa intestinale, inducendo o promuovendo la progressione tumorale. Soltanto il 20% circa dei CRC è infatti di natura ereditaria. Si tratta in genere di malattie trasmesse da genitori portatori di specifiche alterazioni genetiche e che possono anche non dar luogo ad alcun sintomo (Tabella 1). Tra le patologie che conferiscono una predisposizione familiare al CRC la più comune è la poliposi adenomatosa familiare (FAP), che assieme ad altre poliposi ereditarie e alla carcinosi ereditaria del colon-retto su base non poliposica (HNPCC o sindrome di *Lynch*) è responsabile di circa il 5% dei CRC ereditari (2). La probabilità di trasmettere alla prole il gene alterato è del 50 per cento, indipendentemente dal sesso.

Condition	Clinical features	Genes responsible
Familial adenomatous polyposis (FAP)	Hundreds to thousands of adenomatous polyps in colon and rectum	<i>APC</i>
Hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC)	Family history of CRC and other cancers	<i>hMLH1, hMSH2, hMSH6, hMSH3, hPMS2</i>
Peutz Jegher's syndrome	Hamartomatous polyps in small bowel and peri-oral pigmentation	<i>LKB1, STK11</i>
Juvenile polyposis	Hamartomatous polyps in stomach and large bowel	<i>SMAD4, PTEN, BMPR1A</i>
Hereditary gastric cancer	Family history of gastric carcinoma and CRC	<i>CDH1</i>

Tabella 1. Sindromi cliniche con un aumentato rischio per il carcinoma del colon-retto e loro basi genetiche (da Fearnhead NS. et al, British Medical Bulletin 2002).

Più dell'80% dei tumori del colon-retto è sporadico, con la presenza di alterazioni genetiche multiple: l'85% dei casi di CRC è caratterizzato da instabilità cromosomica (CIN), in forma di aneuploidie che comportano amplificazioni e delezioni di regioni cromosomiche, in grado di causare perdita di eterozigosi (LOH) (3). Il rimanente 10-15% dei casi di CRC sporadico, oltre

a quasi la totalità dei CRC ereditari con HNPCC, è caratterizzato da instabilità dei microsatelliti (MSI). Questa forma di instabilità genetica è associata ad inattivazione biallelica di geni implicati nella riparazione dei danni al DNA, che nelle forme sporadiche è dovuta a metilazione del promotore del gene MLH1, mentre nelle forme ereditarie è caratterizzata da mutazioni di tali geni nella linea germinale (4).

La più comune classificazione istopatologica del CRC, sia sporadico che ereditario, proviene dall'American Joint Committee on Cancer (AJCC), è in vigore in tutto il mondo dalla metà degli anni 80 e si basa su 3 parametri (5): il parametro T, che indica il grado di invasione della parete intestinale; il parametro N, che indica il grado di coinvolgimento dei linfonodi; il parametro M, che misura il grado di metastatizzazione (Tabella 2). Per questo motivo il sistema è detto TNM e rappresenta un'evoluzione del sistema di Dukes, più semplice, meno stratificato e basato sempre su parametri morfologici.

Stadio AJCC	Stadio TNM	Criteri per la stadiazione TNM nel carcinoma coloretale
Stadio 0	Tis N0 M0	Tis: Tumore confinato alla mucosa; carcinoma in situ
Stadio I	T1 N0 M0	T1: il tumore invade la sottomucosa
Stadio I	T2 N0 M0	T2: il tumore si estende alla muscolatura propria
Stadio II-A	T3 N0 M0	T3: il tumore si estende alla sottosierosa o ai tessuti pericolici nei tratti in cui il viscere non è rivestito dal peritoneo o perirettali
Stadio II-B	T4 N0 M0	T4: il tumore permea il peritoneo viscerale o si diffonde in organi contigui
Stadio III-A	T1-2 N1 M0	N1: presenza di metastasi da 1 a 3 nei linfonodi regionali. T1 o T2.
Stadio III-B	T3-4 N1 M0	N1: presenza di metastasi da 1 a 3 nei linfonodi regionali. T3 o T4.
Stadio III-C	T1-T4, N2 M0	N2: presenza di metastasi in 4 o più linfonodi. T1-T4.
Stadio IV	T1-T4, N1-N3, M1	M1: presenza di metastasi nei linfonodi dislocati lungo il decorso dei vasi venosi di maggior calibro. T1-T4, N1-N3.

Tabella 2: Classificazione istopatologica del tumore al colon-retto.

Questo sistema può essere migliorato se si considerano marcatori molecolari che migliorano la stratificazione dei pazienti e quindi il successivo trattamento. Questi marcatori sono principalmente 2: l'instabilità dei microsatelliti nel DNA (MSI, *DNA microsatellite instability*) e lo stato di metilazione di alcune isole CpG definito *CpG island methylator phenotype* (CIMP). L'instabilità dei microsatelliti, trovata nel 15% dei tumori sporadici, coinvolge geni come TGFβIIIR, E2F4 e BAX. Il fenotipo CIMP invece si basa sullo stato di metilazione dei promotori di alcuni geni tra cui CACN1G, CDKN2A,

CRABP1, IGF2, MLH1, NEUROG1, RUNX3 e SOCS1 (6). Secondo questi due parametri i tumori al colon-retto posso essere definiti: MSI-high (MSI-H), MSI-low (MSI-L), MS stable (MSS), CIMP-high (CIMP-H), CIMP-low (CIMP-L) e CIMP-negative (CIMP-neg). In base alle combinazioni fenotipiche avremo diversi sottotipi tumorali (7):

1. Tipo 1: CIMP-H, MSI-H, BRAF mutato
2. Tipo 2 :CIMP-H, MSI-L o MSS, BRAF mutato
3. Tipo 3: CIMP-L, MSI-L o MSS, KRAS mutato
4. Tipo 4: CIMP-neg, MSS
5. Tipo 5 o sindrome di Lynch: CIMP-neg, MSI-H

I più comuni tumori invasivi (adenocarcinomi) del colon-retto sono dovuti alla crescita anomala delle cellule della mucosa colica, cioè del rivestimento interno dell'organo. Dal punto di vista istologico ed epidemiologico i tumori del colon si mantengono distinti da quelli del retto (che si sviluppano entro 11 cm dall'ano) in quanto mostrano incidenza e mortalità diverse. Ciò suggerisce che i due tumori possano avere cause correlate, ma non completamente identiche, e caratteristiche biologiche diverse. La storia naturale di tale neoplasia è fortemente condizionata dallo stadio della malattia. Il CRC é infatti un tumore con elevata percentuale di guarigione quando ancora limitato alla membrana basale, mentre diventa altamente letale, e la sua progressione poco controllabile con la terapia, quando supera i confini della parete e metastatizza ai linfonodi. Conseguentemente la sopravvivenza, correlata con lo stadio della

malattia al momento della diagnosi, è superiore nei pazienti con cancro localizzato mentre è minima nei pazienti con malattia metastatica.

1.2.1 ALTERAZIONI GENETICHE CLASSICHE ASSOCIATE AL CRC

La progressione tumorale dallo stato di adenoma a quello di carcinoma è accompagnata da alterazioni genetiche multiple ed è conosciuta come sequenza adenoma-carcinoma (Figura 1) (8).

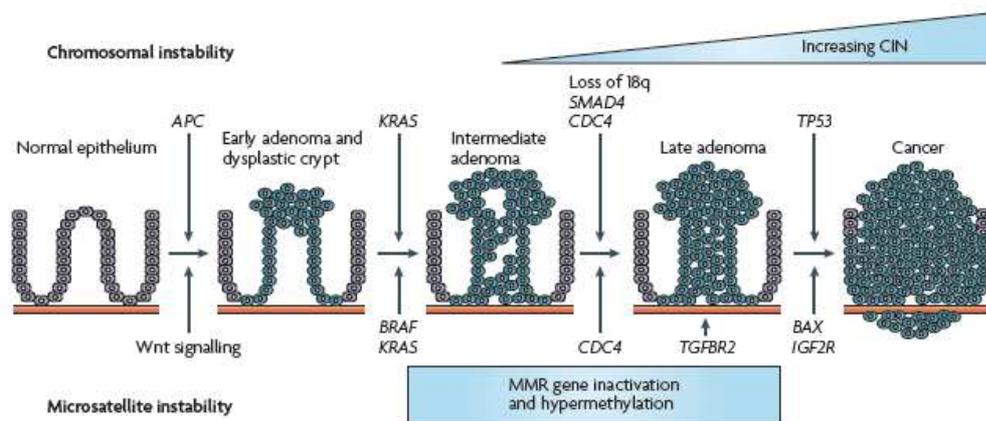


Figura 1: Descrizione della sequenza adenoma-carcinoma. L'ordine temporale in cui i geni chiave possono essere interessati è mostrata insieme allo stadio istologico del tumore (da Walther A. et al, Nat Rev Cancer 2009).

Il CRC prende origine, in oltre il 90% dei casi, da un precursore focale, displastico, polipoide: l'adenoma o polipo adenomatoso. Si tratta di piccole escrescenze, di per sé benigne, dovute al proliferare delle cellule della mucosa intestinale. Non tutti i polipi tendono a degenerare e la probabilità di trasformazione neoplastica aumenta nei cosiddetti “adenomi ad alto rischio”

che presentano, cioè, caratteristiche microscopiche specifiche (componente villosa, displasia grave) e dimensioni superiori a un centimetro. Si stima che circa il 25% degli adenomi ad alto rischio si trasformi in tumore maligno attraverso una serie di passaggi intermedi legati a mutazioni di carattere genetico. L'evento più precoce nella tumorigenesi del CRC è legato alla formazione dei polipi adenomatosi in seguito alla mutazione inattivante o alla perdita del gene APC (*Adenomatous Polyposis Coli*), riscontrata in circa l'80% dei casi di CRC. Esso codifica per una proteina citoplasmatica che promuove la degradazione della beta-catenina, limitando in questo modo la trascrizione dei geni del ciclo cellulare controllati da Wnt (9). Tale gene è un *tumor suppressor* ed è coinvolto in una varietà di processi cellulari oltre alla proliferazione cellulare, quali migrazione cellulare e adesione, è correlato al mantenimento della stabilità cromosomica, nonché dell'organizzazione del citoscheletro. L'aggravarsi degli adenomi e la progressione verso la forma di carcinoma è legata all'acquisizione di mutazioni a livello del gene KRAS. La famiglia Ras è costituita da tre membri noti come HRAS, KRAS ed NRAS, localizzati su cromosomi differenti da proto-oncogeni e codificanti proteine G del peso di 21 KDa. La proteina KRAS è localizzata nella membrana cellulare ed è dotata di attività GTPasica (10). Il legame extracellulare di specifici ligandi al recettore transmembrana come l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) comporta l'attivazione di una cascata di eventi di trasduzione del segnale che mediano le risposte cellulari ai segnali di crescita. Il 50% dei casi di CRC sporadico presenta mutazioni puntiformi a carico del gene KRAS, il 70% delle quali si verifica a livello dei codoni 12 e 13 (11). La mutazione attivante KRAS svolge

un ruolo fondamentale nella progressione tumorale di CRC, in quanto sembrerebbe essere associata all'acquisizione di un comportamento più invasivo da parte delle cellule tumorali, ed è seguita da delezioni del cromosoma 18q con la perdita di SMAD4, localizzato a valle di TGF β (*Transforming Growth Factor- β*), e da mutazioni del gene TP53 nel passaggio da adenoma avanzato a carcinoma. Il gene TP53 è frequentemente deletato nelle forme tumorali ad alto rischio, che hanno una minor probabilità di sopravvivenza, ma tuttavia non è del tutto considerato un marcatore prognostico come KRAS poiché non è stato possibile correlare la sua perdita all'*outcome* dei pazienti nel trattamento farmacologico (12). Nei casi di CRC caratterizzati da MSI possono verificarsi delle alterazioni geniche differenti, ma dalle funzioni analoghe, rispetto a quelle descritte per i casi con instabilità cromosomica. In questi casi, le prime tappe della tumorigenesi coinvolgono alterazioni della cascata di segnali attivata da WNT. Tale alterazione è frequentemente seguita, nei casi con MSI, da mutazioni del gene BRAF (una chinasi a valle di KRAS) piuttosto che da mutazioni in KRAS: le mutazioni dei due geni sono mutualmente esclusive, ed è stato dimostrato che mutazioni di BRAF hanno un effetto biologico simile a quello determinato dalle mutazioni di KRAS, in quanto entrambe si verificano all'interno della stessa *pathway* cellulare e nella stessa fase di passaggio dall'adenoma al carcinoma; d'altra parte, le mutazioni del gene BRAF sono in genere riscontrate in tumori meno avanzati, a differenza delle mutazioni di KRAS (13, 14). La presenza di mutazioni di microsatelliti a livello dei geni TGFBR2 (*TGF β Receptor 2*), IGF2R (*Insulin-like Growth Factor 2 Receptor*) e BAX, determina

l'attivazione di un meccanismo di progressione tumorale indipendente da TP53.

1.2.2 ALTRE ALTERAZIONI GENETICHE

Uno degli oncogeni a più alta frequenza di mutazione nei tumori solidi è il fattore di trascrizione MYC, che risulta amplificato e sovraespresso nel tumore al colon, alla prostata, al polmone e nel medulloblastoma (15). I geni attivati da MYC sono coinvolti nel metabolismo cellulare, nella biosintesi delle proteine, nel ciclo cellulare e apoptosi e per molti microRNA, come il cluster miR-17-92, sovraespresso in molti tumori e considerato ormai un oncomiR (16), è stato ormai dimostrato il controllo diretto o indiretto da parte di MYC. Inoltre MYC è a sua volta controllato dalla *pathway* di Wnt/ β -catenina, che ne promuovono l'espressione, e per questo motivo gioca un ruolo nella formazione delle cellule staminali tumorali o *cancer initiating cells* (9). Queste cellule rappresentano solo una piccola sottopopolazione, presentano specifici marcatori di superficie (CD133 nel tumore al colon) ed hanno un'estensiva capacità proliferativa *in vitro* e tumorigenica *in vivo* (17).

Coinvolto nel mantenimento di un fenotipo *stemness* e associato al tumore al colon, il gene *tumor-suppressor* PTEN, che codifica per una fosfatasi che trasforma il PIP3 (fosfatidil-inositolo 3-fosfato) in PIP2 (fosfatidil-inositolo 2-fosfato), determina il blocco del segnale di proliferazione cellulare innescato da questo secondo messaggero. Questo gene risulta mutato o deletato in molte forme tumorali e la sua normale attività si esplica determinando il blocco dei

segnali proliferazione e l'induzione all'apoptosi (18). Nel tumore al colon in particolare la sua perdita è correlata a forme ereditarie rare associate alla *PTEN Hamartoma Tumor Syndrome* (PHTS) (19) e alla resistenza farmacologica (20,21). Anche altri geni della *pathway* del fosfatidil-inositolo 3-fosfato sono stati trovati mutati in CRC. Ad esempio, il gene *PIK3CA (Phosphoinositide-3-Kinase, Catalytic, Alpha)* rappresenta uno dei geni a più alta frequenza di mutazione sia nel tumore al colon-retto che in quello al seno (22), e sue mutazioni attivanti sono associate a resistenza farmacologica (20,21).

Recenti progressi nell'applicazione degli studi di associazione genomica o *Genome-Wide Association Study* (GWAS) hanno permesso l'identificazione di nuovi geni candidati fattori di rischio o di suscettibilità coinvolti nel CRC. Fino a metà del 2007 non era stato identificato nessun polimorfismo o varianti comuni che in maniera riproducibile potevano essere associati al rischio di insorgenza di CRC. Una maggiore rigosità nella selezione del fenotipo e l'avvento di metodiche di *screening* per polimorfismi tramite piattaforme *high-throughput* (HT) ha permesso negli ultimi anni di identificare 10 varianti a bassa penetranza associate al CRC che potrebbero contribuire all'eziologia del tumore. Tra le dieci varianti di suscettibilità identificate vi sono SNP associati a geni della famiglia del $TGF\beta$, inclusi *SMAD7*, *GREM1*, *BMP2*, *BMP4* e *RHPN2*. Questa elevata rappresentanza di geni della famiglia $TGF\beta$ suggerisce un ruolo chiave di questa *pathway* nella predisposizione alle forme sporadiche del CRC (23).

1.3.1 PREVENZIONE E DIAGNOSI

L'evoluzione del CRC è lenta; per questo motivo, lo *screening* è uno strumento importante per la diagnosi precoce e per organizzare una migliore strategia terapeutica. Esistono chiare evidenze che la riduzione della mortalità per CRC può essere ottenuta attraverso l'identificazione e il trattamento della neoplasia in stadio precoce e soprattutto con l'asportazione dei polipi adenomatosi, precursori del CRC. Infatti, la maggior parte dei CRC sono adenocarcinomi e derivano dalla trasformazione di un polipo adenomatoso attraverso la sequenza adenoma-carcinoma. E' acquisizione recente che lo sviluppo, la crescita e la eventuale trasformazione maligna dei polipi adenomatosi sono associate all'accumulo di alterazioni di oncogeni e geni oncosoppressori. Talune alterazioni genetiche, quando ereditate e presenti in tutte le cellule dell'organismo, predispongono all'insorgenza dei CRC ereditari. Più frequentemente i fattori ambientali alterano direttamente, nel corso della vita, il DNA delle cellule epiteliali della mucosa intestinale, inducendo o favorendo la progressione tumorale. L'obiettivo di questi *screening* è quello di ridurre in modo significativo l'incidenza e la mortalità per carcinoma colon retto attraverso varie strategie:

- Prevenzione primaria
- Prevenzione secondaria
- Diagnosi precoce
- Sorveglianza di soggetti a rischio elevato
- Informazione della popolazione

1.3.2 TEST DIAGNOSTICI

Ricerca di sangue occulto nelle feci

Si tratta di un test di *screening* da effettuare annualmente. Deve essere fatto su tre defecazioni consecutive; se positivo il corretto approfondimento diagnostico è la colonscopia, in alternativa la rettosigmoidoscopia e il clisma opaco a doppio contrasto.

Rettosigmoidoscopia

La rettosigmoidoscopia si avvale di un endoscopio per esplorare la parte terminale dell'intestino crasso (colon sigma e retto). I polipi evidenziati possono essere asportati endoscopicamente; ma comunque deve essere consigliata l'esplorazione di tutto il colon, con colonscopia, per escludere altre proliferazioni nei distretti non esplorati. L'unione di questa tecnica di *screening* con la precedente aumenta in percentuale il riconoscimento di lesioni neoplastiche.

Clisma a doppio contrasto

È una radiografia dell'intestino, previa introduzione di una miscela di aria e bario, che funge da mezzo di contrasto. Non può essere considerato un valido test di *screening* dal momento che può non evidenziare piccoli polipi, non permette l'esecuzione di biopsie, né l'asportazione di polipi. Nei casi dubbi è sempre indicata l'esecuzione di colonscopia.

Colonscopia

Questo esame permette la visualizzazione di tutto il colon, l'identificazione ed asportazione di tutti i polipi nonché la possibilità di effettuare biopsie. Non mancano degli svantaggi che includono la preparazione, il disagio per il paziente, potenziali complicanze, i costi e la possibile carenza di strutture. In virtù del lungo effetto protettivo e dell'alta sensibilità la colonscopia può essere considerata il più efficace test di *screening*. Per ovviare al disagio derivante da una colonscopia normale recentemente è stata messa a punto la colonscopia virtuale, un esame di tomografia assiale computerizzata (TAC) dell'addome, eseguito dopo aver disteso il colon con aria o anidride carbonica. Completato l'esame, le immagini TAC sono inviate a un computer ed elaborate da un software dedicato che consente la visualizzazione della superficie interna del colon in 2 e 3 dimensioni. In caso di riscontro di polipi o tumori il soggetto dovrà comunque eseguire una colonscopia tradizionale per la biopsia o una polipectomia.

1.4.1 TARGETS MOLECOLARI E TRATTAMENTO DEL CARCINOMA COLO-RETTALE

Il tipo di trattamento del CRC dipende da una pluralità di fattori e principalmente dalle dimensioni, dalla localizzazione e dall'estensione del tumore, nonché dalle condizioni generali del paziente. Sono applicabili vari tipi di trattamento, dall'intervento chirurgico (che consente l'asportazione della massa tumorale unitamente ad una porzione sana dell'organo e ai linfonodi adiacenti), alla radioterapia, immunoterapia o chemioterapia. Quest'ultima, che

consiste nell'utilizzo di farmaci antitumorali per distruggere le cellule cancerose, viene impiegata oltre che per controllare la crescita neoplastica o alleviare i sintomi della malattia, anche dopo trattamento chirurgico ai fini di eliminare le cellule tumorali residue. Talvolta diventa necessario utilizzare combinazioni di trattamenti diversi. Attualmente, sono disponibili differenti regimi di agenti chemioterapici dotati di effetto citotossico, quali le fluoropirimidine (inibitori della timidilato sintasi), l'oxaliplatino (un analogo del platino che viene spesso associato alla terapia con fluoropirimidine), o l'irinotecan (un inibitore della topoisomerasi I). Tuttavia, le nuove linee di ricerca farmacologica si sono rivolte all'identificazione di agenti in grado di interferire in maniera selettiva contro bersagli molecolari specifici al fine di aumentare la selettività del bersaglio e di ridurre gli effetti collaterali sistemici. Questi nuovi farmaci vengono usati sia da soli che in associazione ad agenti chemioterapici classici in *trials* chemioterapici. Tra i nuovi farmaci più utilizzati nel trattamento del CRC si annoverano gli inibitori dell'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) e gli inibitori delle tirosin-chinasi a basso peso molecolare, oppure gli inibitori del VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) come il bevacizumab.

1.4.2 TERAPIA ANTI-EGFR: CETUXIMAB E PANITUMUMAB

L'EGFR è un membro della famiglia di recettori ErbB, costituita da quattro recettori correlati tra loro, ErbB1, ErbB2, ErbB3 ed ErbB4, che nella loro forma attiva formano omodimeri od eterodimeri i quali vengono stabilizzati dal legame del loro ligando (24). L'EGFR rappresenta il collegamento tra lo spazio extracellulare ed il sistema intracellulare di trasduzione del segnale che regola i processi nucleari coinvolti nella crescita cellulare, differenziamento, sopravvivenza, progressione attraverso il ciclo cellulare, angiogenesi e sensibilità ai farmaci (13). Sono stati identificati diversi ligandi per l'EGFR, tra cui EGF, TGF α e la neoregulina; il loro legame nella porzione extracellulare del recettore ne determina l'attivazione tramite autofosforilazione del dominio tirosin-chinasico, che a sua volta è responsabile dell'attivazione della cascata di segnali intracellulari. Sono state individuate diverse *pathways* controllate da questi recettori, tra cui quelle di JAK-STAT, PIK3-AKT e la cascata RAS-RAF-MAPKs. Quest'ultima è innescata dall'attivazione di RAS e a successive serie di fosforilazioni in grado di attivare le MAPKs, ERK1 ed ERK2. ERK1/2 regolano la trascrizione di molecole associate alla proliferazione, sopravvivenza e trasformazione (Figura 2) (25).

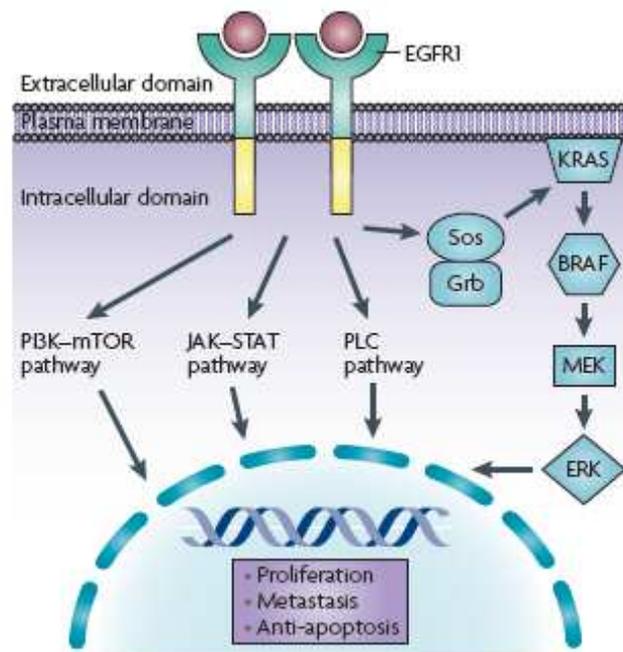


Figura 2. EGFR e *pathways* molecolari da esso regolate (da Walther A. et al, Nat Rev Cancer 2009).

L'EGFR è frequentemente sovraespresso o iperattivato nei tumori di origine epiteliale, incluso il CRC, e tale sovraespressione è stata spesso associata alla resistenza dei tumori ai farmaci dotati di attività citotossica, tanto da rappresentare un indicatore di prognosi sfavorevole (26).

Fin dal 1994 sono state create delle molecole ad azione inibitoria del dominio tirosin-chinasico del recettore, come il Gefinitib (Iressa), usato nei *trials* clinici a partire dal 2003. L'approccio terapeutico più recente è rappresentato invece da anticorpi monoclonali rivolti contro l'EGFR, in grado di inibire l'interazione tra l'EGFR ed i suoi ligandi naturali nello spazio extracellulare. Il recettore viene internalizzato e degradato portando al blocco del ciclo cellulare, all'inibizione dell'angiogenesi, invasione e meta statizzazione; inoltre l'azione

antitumorale viene condotta attraverso fenomeni di citotossicità cellulare mediata da anticorpi (27).

Dal 2004 ad oggi sono state sviluppate diverse terapie basate su anticorpi monoclonali contro l'EGFR. Tra le prime molecole utilizzate sui pazienti ci sono stati il Cetuximab (Erbix) e il Panitumumab (Vectibix) (Figura 3).

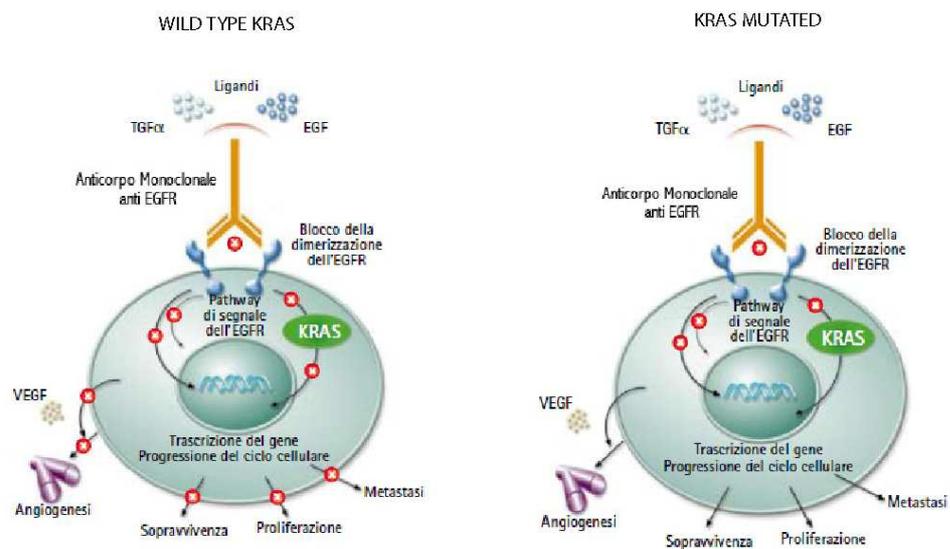


Figura 3. Terapia anti-EGFR e mutazioni di KRAS.

Il Cetuximab è un anticorpo monoclonale IgG1 chimerico uomo/topo e ad ampia azione, che agisce contro il dominio extracellulare dell'EGFR (11). Come anticorpo monoclonale, la modalità di azione del Cetuximab si distingue dai trattamenti chemioterapici standard non selettivi: il legame comporta l'internalizzazione del recettore causando una diretta inibizione della sua attività tirosin-chinasica. Ciò a sua volta provoca il blocco della trasduzione del segnale attraverso le vie PI3K/AKT e RAS-RAF/MAPKs, inducendo meccanismi proapoptotici ed inibendo la proliferazione cellulare, l'angiogenesi e la formazione di metastasi (Figura 3) (25). Ciò comporta la riduzione sia

dell'invasione dei tessuti normali da parte delle cellule tumorali sia dell'espansione del tumore a nuovi siti. Si ritiene, inoltre, che il Cetuximab sia in grado di inibire l'attività riparatoria delle cellule tumorali verso il danno causato dalla chemioterapia e radioterapia, e di impedire la formazione di nuovi vasi sanguigni all'interno dei tumori; ciò si traduce in una globale soppressione della crescita tumorale. Inoltre, quando le metastasi sono limitate al fegato, la diminuzione della massa tumorale in molti casi consente la resezione chirurgica del tumore, con maggiori probabilità di cura. L'effetto collaterale più comune associato alla somministrazione del Cetuximab è uno sfogo epidermico simile all'acne che sembra comunque essere correlato ad una buona risposta alla terapia (28). L'efficacia anti-tumorale del Cetuximab è stata dimostrata sia da solo che in combinazione con altri agenti chemioterapici: ad esempio, in pazienti metastatici con tumore al colon o carcinoma della testa e collo a cellule squamose, viene usato in associazione con l'irinotecan.

Il Panitumumab è un anticorpo monoclonale della classe IgG2, ed è il primo anticorpo monoclonale totalmente umano utilizzato in ambito terapeutico; come il Cetuximab, esso agisce inibendo l'attività dell'EGFR, bloccando il legame con l'EGF e il TGF- α (29). Fin dal 2006 è stato approvato il suo utilizzo e ha mostrato una notevole efficacia antitumorale nei pazienti sia da solo che in combinazione con le fluoropirimidine, oxaliplatino e irinotecan.

E' noto che non tutti i pazienti affetti da CRC rispondono in modo positivo alla terapia con il Cetuximab o il Panitumumab: vi sono infatti dei fattori genetici predittivi della risposta, tra i quali sicuramente il più significativo e ormai validato da diverso tempo è lo stato mutazionale di KRAS (Figura 3).

Numerosi *trials* condotti negli ultimi anni hanno dimostrato che i pazienti CRC che presentano specifiche mutazioni puntiformi del gene KRAS a livello dei codoni 12 e 13 non rispondono alla terapia, mentre tutti i pazienti che rispondono positivamente al farmaco sono privi della mutazione (30, 31). Oltre a KRAS, altri fattori coinvolti nell'efficacia della risposta alla terapia anti-EGFR sono il numero di copie di EGFR e la sua espressione, lo stato mutazionale di BRAF, PIK3CA e PTEN, ma la loro efficacia predittiva nella risposta alla terapia è tutt'ora da provare.

1.4.3 MECCANISMI MOLECOLARI DI RESISTENZA ALLA TERAPIA ANTI-EGFR

Come già detto KRAS rappresenta il più forte marcatore predittivo della risposta al Cetuximab/Panitumumab e il suo status mutazionale viene routinariamente controllato prima di intraprendere la terapia. Oltre alle mutazioni attivanti su KRAS esistono altri meccanismi molecolari di resistenza ad oggi non del tutto chiariti, come le mutazioni attivanti su BRAF, molto comuni in diversi tumori. E' stato infatti osservato che le mutazioni BRAFV600 in pazienti CRC sono associate a resistenza alla terapia anti-EGFR (32), ma poiché tali studi sono stati condotti su un numero ancora basso di pazienti, il ruolo di BRAF come marcatore predittivo nella terapia rimane elusivo. Inoltre, nonostante siano stati condotti numerosi studi sia nel tumore al colon che in altri tumori con sovraespressione di EGFR, non è stata trovata associazione predittiva tra il numero di copie e/o la sovraespressione di questo recettore con la resistenza alla terapia anti-EGFR e ciò ha fatto ipotizzare che, a

parte le mutazioni su KRAS, esistano altri meccanismi molecolari di resistenza. La sovraespressione di VEGF e VEGFR in cellule tumorali *in vitro* e la successiva promozione dell'angiogenesi *in vivo* è uno degli ipotetici meccanismi di resistenza più accreditati e a tal proposito sono in corso studi per la creazione di molecole con doppia azione anti-EGFR/VEGF (33). Un altro affascinante meccanismo di resistenza sarebbe dovuto alla localizzazione nucleare di EGFR, trovata in molte patologie umane e associata all'attività della proteina come fattore di trascrizione. La traslocazione nucleare sarebbe mediata dalle chinasi oncogeniche della famiglia Src, che sono associate anche a un altro meccanismo di resistenza alla terapia anti-EGFR, cioè quello legato all'iper-attivazione del dominio tirosin-chinasico del recettore (33). Infine, l'espressione di varianti troncate di EGFR prive del dominio di legame al ligando e che sono quindi costitutivamente attive, come EGFRvIII (sovraespresso nel tumore al polmone) potrebbe rappresentare un ulteriore meccanismo di resistenza diverso dalle mutazioni su KRAS.

1.5 MICRORNA

I miRNA costituiscono una famiglia di piccoli RNA endogeni, non codificanti, a singolo filamento (*ss*), di una lunghezza compresa tra i 21 e i 25 nucleotidi, il cui ruolo fondamentale è quello di regolare negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale (*post-transcriptional gene silencing*, PTGS) negli animali e nelle piante. In particolare, i miRNA agiscono mediante il riconoscimento di specifici mRNA *targets* al fine di determinarne la degradazione o la repressione della traduzione.

Da un punto di vista funzionale è stato dimostrato che esistono numerosi miRNA capaci di riconoscere più *targets*, e che molti di questi possono essere regolati da diversi miRNA. Tali affermazioni consentono pertanto di considerare i singoli miRNA come piccoli elementi di controllo di più complesse *pathways* regolatrici, che nei fatti stanno alla base di numerose e fondamentali funzioni, che spaziano da quelle prettamente cellulari, tra cui la regolazione del ciclo cellulare, la proliferazione cellulare, il differenziamento e l'apoptosi, per poi coinvolgere alcuni processi che riguardano l'intero organismo, comprendenti lo sviluppo embrionale e la risposta immunitaria, e numerose altre. Inoltre recenti studi hanno dimostrato il ruolo fondamentale dei miRNA nel *self-renewal* e nel differenziamento delle cellule staminali. I miRNA svolgono le loro funzioni in modo fisiologico, poiché presentano degli specifici e dinamici *patterns* di espressione temporale e spaziale. Tuttavia, è stato dimostrato che nel caso in cui la loro espressione risulti essere alterata, i miRNA possono essere coinvolti in diverse malattie complesse, tra cui numerosi tumori (Tabella 3).

Expression pattern	microRNA	References
Tissue-specific expression patterns of mammalian microRNAs		
ES-cell specific	miR-296	86
Expressed in ES cells, but upregulated on differentiation	miR-21 and miR-22	86
Expressed in both ES cells and various adult tissues	miR-15a, miR-16, miR-19,b, miR-92, miR-93, miR-96, miR-130 and miR-130b	86
Enriched during mouse brain development	miR-128, miR-19b, miR-9, miR-125b, miR-131, miR-178, miR-124a, miR-266 and miR-103	26,90
Enriched in adult brain	miR-9*, miR-125a, miR-125b, miR-128, miR-132, miR-137, miR-139, miR-7, miR-9, miR-124a, miR-124b, miR-135, miR-153, miR-149, miR-183, miR-190 and miR-219	26
Enriched in lung	miR-18, miR-19a, miR-24, miR-32, miR-130, miR-213, miR-20, miR-141, miR-193 and miR-200b	26
Enriched in spleen	miR-99a, miR-127, miR-142-a, miR-142-s, miR-151, miR-189 and miR-212	26
Haemetopoietic tissues	miR-181, miR-223 and miR-142	26
Enriched in liver	miR-122a, miR-152, miR-194, miR-199 and miR-215	26
Enriched in heart	miR-1b, miR-1d, miR-133, miR-206, miR-208 and miR-143	26
Enriched in kidney	miR-30b, miR-30c, miR-18, miR-20, miR-24, miR-32, miR-141, miR-193 and miR-200b	26
Ubiquitously expressed	miR-16, miR-26a, miR-27a, miR143a, miR-21, let-7a, miR-7b, miR-30b and miR-30c	26
Abnormal microRNA expression during tumorigenesis		
Downregulated in chronic lymphocytic leukaemias	miR-15 and miR-16	102
Downregulated in lung cancer cell lines	miR-26a and miR-99a	89
Downregulated in colon cancers	miR143/miR-145 cluster	103
Upregulated in Burkitt lymphoma	miR-155	88
ES cells, embryonic stem cells.		

Tabella 3. Elenco di alcuni miRNA tessuto-specifici, e di alcuni coinvolti in patologia. Da notare il gran numero di referenze associate ad ogni miRNA (da He L. et al, Nat Rev Gen 2004).

Pertanto, l'azione ad ampio spettro dei miRNA costituisce un nuovo ed altamente regolato livello di controllo dell'espressione genica, essenziale nella normale fisiologia delle cellule animali e vegetali.

1.5.2 ORGANIZZAZIONE DEI MICRORNA NEL GENOMA UMANO

Ad oggi sono stati identificati centinaia di miRNA umani, 940 secondo la più recente versione di *miRBase*, sia mediante un approccio sperimentale sia mediante analisi computazionale. Tutti i miRNA scoperti vengono infatti puntualmente depositati nel *Sanger centre miRBase database*, un vero e proprio registro dei miRNA, in cui sono annotate tutte le loro caratteristiche,

accessibili *online* (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml>). In tale *database* sono presenti anche le informazioni che riguardano la genomica dei miRNA, ovvero il modo in cui i loro geni sono organizzati sui cromosomi umani. In particolare, i geni codificanti i miRNA sono distribuiti su tutti i cromosomi, eccetto il cromosoma Y, e nel 50% dei casi geni per differenti miRNA sono localizzati in loci adiacenti, organizzandosi in veri e propri *clusters*, ad esempio, il *cluster* costituito dai miRNA hsa-let-7a-1, hsa-let-7f-1 e hsa-let-7d presente nel cromosoma 9. Ciò comporta il fatto che tali geni vengano trascritti simultaneamente generando un trascritto primario policistronico. I miRNA in *clusters* spesso sono correlati funzionalmente, ma non è sempre così poiché questo dipende principalmente dalla sequenza primaria del maturo. Inoltre, si ritiene che la similarità di sequenza tra i diversi miRNA in *cluster* sia dovuta a fenomeni di duplicazione genica simile a quella che avviene per i geni codificanti proteine. Per quanto concerne la localizzazione genomica dei miRNA, essi possono essere distinti in (Figura 4):

- miRNA intergenici
- miRNA intronici in trascritti codificanti
- miRNA intronici in trascritti non codificanti
- miRNA esonici in trascritti non codificanti

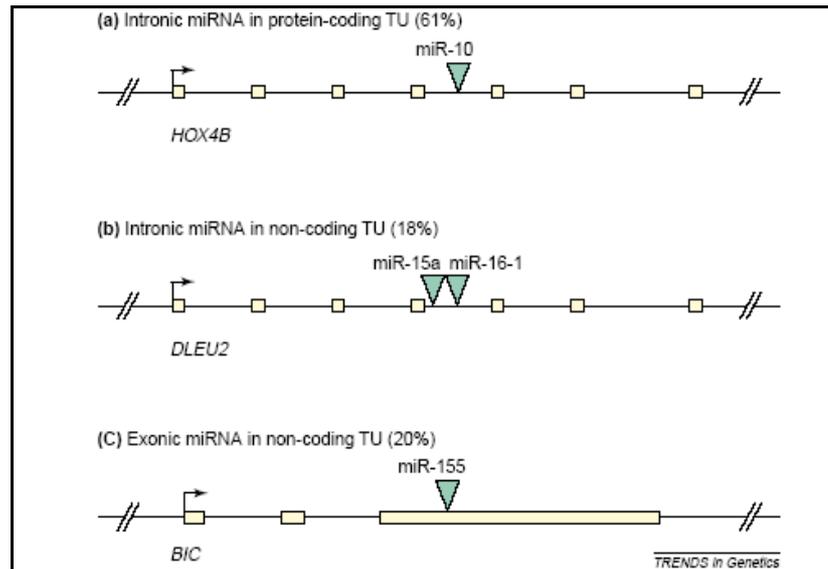


Figura 4. Organizzazione genomica e struttura dei geni dei microRNA. Nell'immagine si può notare la localizzazione della regione corrispondente ai pre-miRNA dei microRNA (triangolini verdi), nell'ambito dell'unità trascrizionale del gene ospite. Da notare, che i quadratini o i rettangoli gialli rappresentano gli esoni, e le linee che vi si frappongono sono gli introni. Inoltre si può individuare la presenza del *cluster* costituito dal miR-15a e dal miR-16-1 (da Kim VN, et al, Trends in Genetics 2006).

1.5.3 BIOGENESI DEI MICRORNA

Il processo mediante il quale si giunge alla formazione dei miRNA maturi è piuttosto complesso e si compone di numerose tappe: esso ha origine nel nucleo e giunge a completamento a livello del citoplasma (Figura 5).

La trascrizione dei geni per i miRNA è mediata prevalentemente dalla RNA Polimerasi II (Pol II) (34, 35) sebbene esistano casi di trascrizione da parte della RNA polimerasi III (Pol III) (36): il risultato è una molecola precursore il pri-miR, della lunghezza di diverse centinaia di nucleotidi, che nel nucleo si ripiega a formare una struttura a forcina a doppio filamento, spesso contenente la sequenza per miRNA maturi differenti.

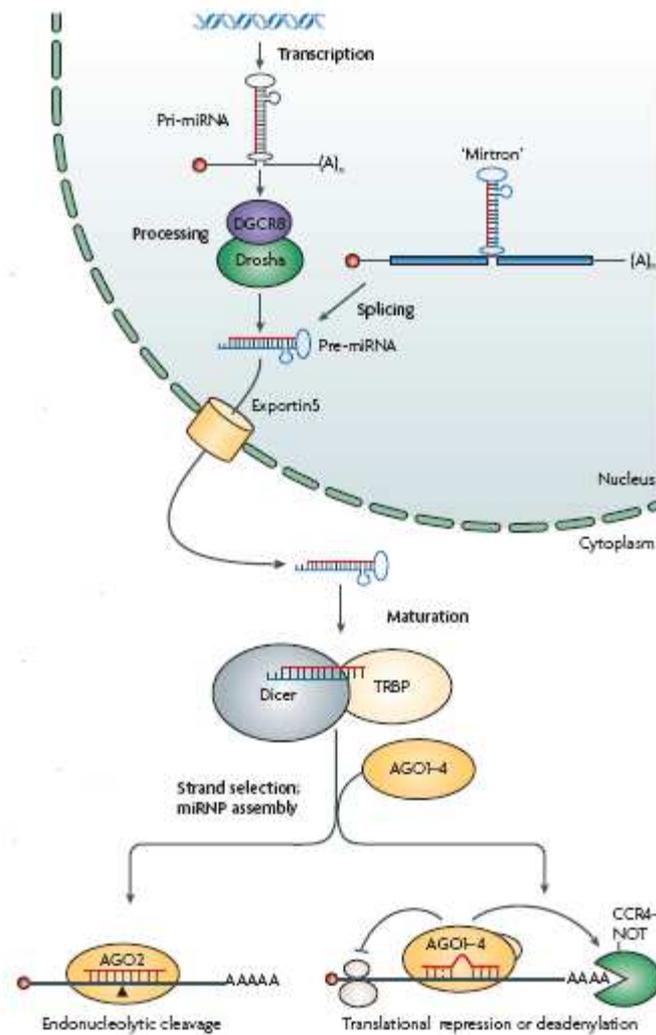
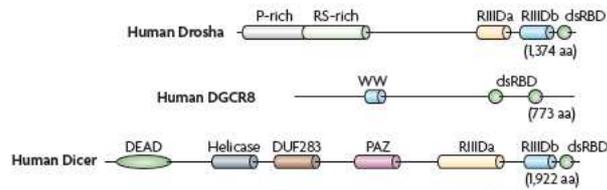


Figura 5. Modello per la biogenesi e per l'attività di soppressione trascrizionale dei microRNA (da Filipowicz W et al. Nat Rev Genet 2008).

Questa molecola subisce dei clivaggi sequenziali catalizzati da due endonucleasi, Drosha e Dicer, entrambi le quali agiscono all'interno di complessi insieme a proteine contenenti domini in grado di legare molecole di RNA a doppio filamento (*dsRNA binding domains* -dsRBDs) (Figura 5). Le proteine Drosha e Dicer possiedono degli specifici domini catalitici RNAsi di

tipo III (RRIIDa, RRIIDb) conservati, che agiscono generando delle estremità 3' sporgenti di 2 nucleotidi (Figura 6).

A



B

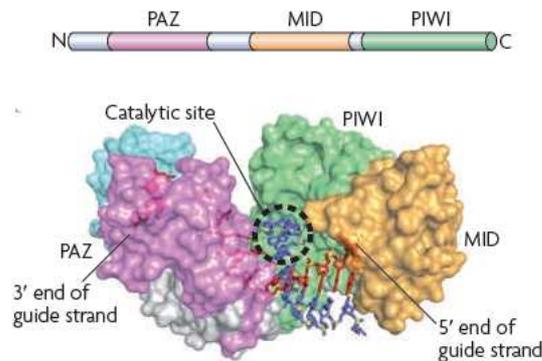


Figura 6. Domini conservati e struttura delle proteine della famiglia RNAsi di tipo III (A) e Argonaute (B) (da Kim VN et al., Nat Rev Mol Cel Biol 2009).

La prima reazione di clivaggio avviene nel nucleo ad opera di Drosha, che forma un complesso con la proteina Pasha (DGCR8), facente parte della stessa famiglia. Il complesso Drosha/Pasha scinde il pri-miR generando una molecola con struttura a forcina di circa 70 nucleotidi, il pre-miR. Dopo l'iniziale clivaggio da parte di Drosha il pre-miR viene esportato dal nucleo al citoplasma ad opera dell'Esportina 5 (Exp5), un trasportatore nucleo/citoplasmatico GTP-dipendente (37). Una volta all'interno del citoplasma, il precursore a forcina viene clivato da Dicer (all'interno di un complesso con TRBP –*TAR RNA binding protein*) con formazione di una

piccola molecola di RNA duplex con appaiamenti imperfetti di dimensioni variabili tra 21 e 25 nucleotidi, contenente sia il filamento maturo del miRNA che il suo filamento complementare (38, 39). Nei mammiferi il Dicer interagisce con le proteine Ago1-Ago4, le quali assemblandosi con il miRNA maturo formano il complesso miRISC (microRna Induced Silencing Complex) che guiderà il miRNA nel riconoscimento del messaggero *target*. Le proteine Ago fanno parte di una antica famiglia, le Argonaute, presenti in tutti gli eucarioti e dotate anch'esse di motivi specifici: i domini PAZ e MID per l'ancoraggio dell'RNA *target* al 3' e 5' e il dominio PIWI per il taglio (Figura 6). Nel complesso del miRISC, oltre alle proteine Ago, sono state trovate proteine della famiglia GW182 (TNRC6A, TNRC6B, TNRC6C nei mammiferi), contenenti glicina e triptofano e del peso di 182 kDa, che sembrerebbero avere un ruolo importante nella repressione trascrizionale mediata dai miRNA (40) e agirebbero come cofattori delle Ago. Al momento in cui il duplex è stato formato in seguito all'azione di Dicer, i due filamenti presentano una stabilità differente da un punto di vista termodinamico a livello dell'estremità 5'; sebbene il miRNA maturo possa essere localizzato in uno o nell'altro filamento in modo indistinto, esso si origina quasi sempre dal filamento che presenta l'estremità 5' più instabile, mentre l'altro filamento verrà degradato (41). Tuttavia, nei rari casi in cui le due estremità 5' presentano una stabilità paragonabile, ognuno dei due filamenti può con la stessa probabilità andare a costituire il miRNA maturo dotato di attività biologica (42).

Un meccanismo a parte è rappresentato da quello che permette la maturazione di una sottofamiglia, i *mirtrons*. Essi si trovano all'interno di introni di trascritti di seconda classe e vengono maturati dopo lo *splicing*, senza l'intervento del Drosha (43). L'RNA che si genera forma una struttura a forcina che viene esportata nel citoplasma dall'Esportina 5 e tagliata direttamente dal Dicer.

1.5.4 REGOLAZIONE POST-TRASCRIZIONALE MEDIATA DAI MICRORNA

Una volta avvenuta la formazione del miRISC, contenente il miR-maturo, può avvenire l'appaiamento di questo con il messaggero *target*. Nei metazoi i siti di legame per i miRNA risiedono a livello della regione 3'UTR delle molecole di mRNA e sono spesso presenti in copie multiple, condizione necessaria affinché si abbia un'efficiente repressione della traduzione (44). È stato tuttavia osservato *in vitro* che il riconoscimento miRNA-mRNA avverrebbe anche nelle regioni codificanti o nel 5'UTR dell'mRNA anche se questi siti di appaiamento non avrebbero sufficiente capacità di silenziamento e svolgerebbero solo un ruolo marginale (45). Negli animali, a differenza delle piante, l'appaiamento con il *target* avviene di solito in maniera imperfetta per la presenza di *bulge* o appaiamenti non canonici GU, ma la condizione più importante affinché il silenziamento avvenga in maniera efficace è che ci sia complementarità perfetta in una regione in 5' del miRNA detta *seed* (che va dal secondo all'ottavo nucleotide del miRNA maturo).

Una volta associato all'mRNA bersaglio, la funzione inibitoria del complesso RISC si esplica mediante diversi possibili meccanismi illustrati nella Figura 7 e che ricadono in due grandi categorie già citate:

- Inibizione della sintesi proteica
- Deadenilazione dell'mRNA cui consegue la degradazione della stessa molecola a causa di un'aumentata instabilità dell'mRNA .

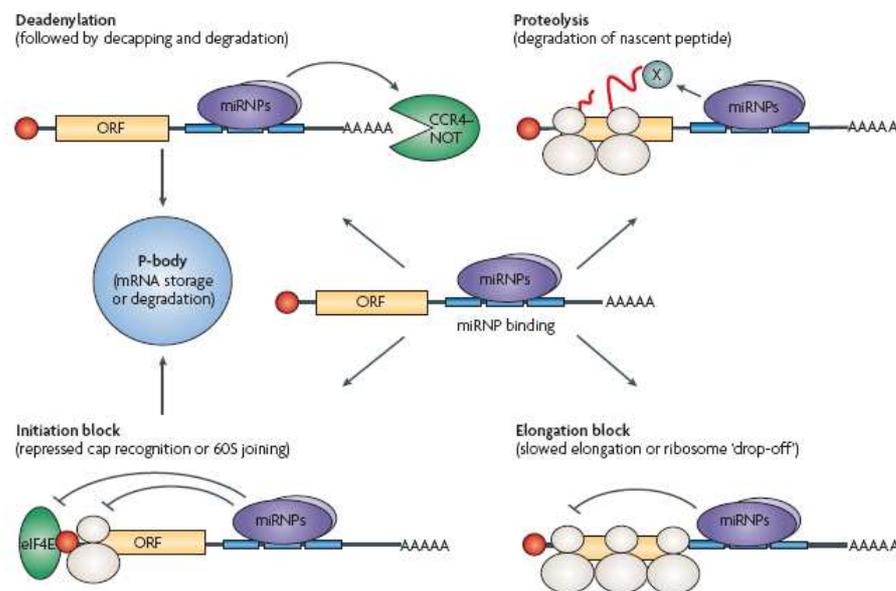


Figura 7. Rappresentazione grafica, di alcuni dei possibili meccanismi d'azione del complesso RISC indotto dai miRNA. Il messaggero *target* può essere deadenilato e degradato, oppure può essere inibita la sua traduzione, in diversi modi qui rappresentati (da Filipowicz W et al., Nat Rev Gen 2008).

La repressione tradizionale avviene nella fase di inizio della traduzione. Negli eucarioti in questa fase viene riconosciuto il *cap* in 5' (m^7GpppN) da parte delle proteine eIF4E, eIF4F, eIF4G; quest'ultimo, legandosi alla proteina PABP1 legata alla coda di polyA favorisce l'avvicinamento delle due estremità del trascritto favorendo così il posizionamento della subunità 40S del ribosoma sul messaggero. Esperimenti con messaggeri reporter aventi *cap*

modificati (cioè ApppN), oppure siti di riconoscimento del ribosoma (IRES) interni, hanno permesso di dimostrare che il complesso del miRISC, ed in particolare le AGO, pur avendo minor affinità per il *cap* di eIF4E, competono con quest'ultimo e impediscono così l'inizio della traduzione (40). Sembra invece meno rilevante l'effetto dei miRISC sul legame della coda di polyA, poiché i dati ottenuti finora dipendono dal modello analizzato *in vitro*, così come è controverso l'effetto nelle fasi di *elongation* della traduzione. Nonostante inizialmente si pensasse che il ruolo dei miRNA si esplicasse solo a livello di repressione traduzionale, oggi si sa che anche essi agiscono anche determinando la degradazione (*decay*) del *target*. Questa avverrebbe secondo un meccanismo ancora poco chiaro, in cui il miRISC recluterebbe i componenti di degradazione dell'RNA (esonucleasi) sul *target*: ciò inizierebbe a livello citoplasmatico e poi seguirebbe in organuli specializzati, i P-bodies. Queste strutture subcellulari rappresenterebbero i siti di deposito e smaltimento dei trascritti e al loro interno sono state trovate oltre alle proteine del macchinario di degradazione, incluse le proteine Ago e GW182 (40). E' stato anche visto che in alcuni casi il processo di repressione traduzionale miRNA-mediato è reversibile e ciò potrebbe essere molto importante nei processi di tipo *switch on-off* durante lo sviluppo. In questi casi è stato osservato che la traduzione del messaggero *target* viene bloccata e riattivata a seconda delle condizioni nutrizionali, come per il miR-122 e il suo *target* CAT1 (46) nelle cellule di epatoma, o a seconda della localizzazione, come per il miR-134 e LIMK1 nei neuroni (47).

1.5.5 REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEI microRNA

La regolazione dell'espressione dei miRNA è fondamentale per il ruolo svolto da queste molecole ed è quindi fortemente regolata in più punti durante la loro biogenesi.

1. Regolazione della trascrizione
2. Regolazione del processamento
3. Editing
4. microRNA decay

La regolazione della trascrizione avviene come molti geni di seconda classe poiché a livello dei promotori dei miRNA sono presenti gli stessi elementi regolativi (TATA box sequences, CpG Islands, initiation elements) dei promotori per i geni codificanti proteine. Molti fattori di trascrizione (TF) regolano l'espressione tessuto-specifica o sviluppo-specifica, ad esempio MYC/MYCN che stimolano l'espressione del cluster oncogenico miR-17-92 in cellule di linfoma (48), o REST che inibisce l'espressione del miR-124 in cellule non neuronali o progenitori neuronali tramite de acetilazione istonica e metilazione del promotore (49). I miRNA stessi possono a loro volta regolare l'espressione dei TF, creando così dei circuiti di regolazione positiva o negativa nei quali il preciso controllo della quantità del miRNA o del TF determina l'effetto fisiologico finale.

La regolazione del processamento dei miRNA avviene al livello del Drosha, del Dicer e delle loro proteine accessorie. Ad esempio è stato visto come

alcune elicasi nel topo (p68 e p72) e le proteine SMAD, trasduttori dei segnali della via del TGF- β e BMP, agiscono a livello del Drosha, controllando la produzione del pri-miR (50). A livello del pre-miR invece è stato visto, ad esempio, che i livelli di Dicer vengono controllati e stabilizzati dal suo cofattore TRBP. Infatti è stato osservato che, dopo stimolazione da parte dei fattori di crescita, ERK fosforila TRBP e quindi stabilizza indirettamente il Dicer, portando a un generale aumento di tutti i pre-miR (51).

L'editing del pri-miR o del pre-miR da parte delle proteine ADAR (*adenosine deaminase*), che catalizzano la conversione dell'adenosina in inosina, altererebbe la struttura secondaria e quindi la stabilità, mentre l'editing nel *seed* del miRNA maturo da parte di altre proteine altererebbe il riconoscimento del *target* (50). Infine la regolazione della stabilità e degradazione del miRNA maturo permette di controllarne la quantità finale nella cellula e quindi l'effetto biologico. È stato osservato che i miRNA sono in generale più stabili dei messaggeri di seconda classe e hanno un'emivita che va da alcune ore a molti giorni. In generale comunque il preciso controllo del *decay* potrebbe avere un ruolo fondamentale nei meccanismi di sviluppo e di risposta di tipo *switch on-off*, ad esempio nello sviluppo della retina del topo in cui i livelli dei miR-204 e miR-211 diminuiscono rapidamente nei neuroni ma non nella glia (52).

1.6.1 MICRORNA E TUMORI

Negli ultimi anni, la lista delle classi di geni classicamente considerati come oncosoppressori o oncogeni è stata rivisitata, essendosi resa necessaria l'espansione di quest'ultima per includere anche la famiglia dei miRNA; queste molecole, come è stato precedentemente asserito, sono in grado di regolare negativamente la stabilità e il processo di traduzione degli mRNA e risultano implicate in diversi processi cellulari quali controllo del ciclo cellulare, differenziamento ed apoptosi. L'espressione dei miRNA è generalmente tessuto-specifica e fortemente dipendente dal livello di differenziamento della cellula, per cui la presenza di significative alterazioni nei livelli di espressione dei miRNA in un tessuto tumorale potrebbero semplicemente rappresentare delle conseguenze secondarie a processi più direttamente implicati nella tumorigenesi, piuttosto che essere un elemento causale direttamente associato alla trasformazione neoplastica della cellula stessa. Un significativo numero di geni dei miRNA sono localizzati in regioni genomiche frequentemente riarrangiate nei tumori, come siti fragili, regioni delete (*minimal region of loss of heterozygosity, LOH*) o amplificate (*minimal amplicons*) e regioni comuni di *break-point*, fornendo un'ulteriore evidenza del loro ruolo nella patogenesi del cancro (53,54).

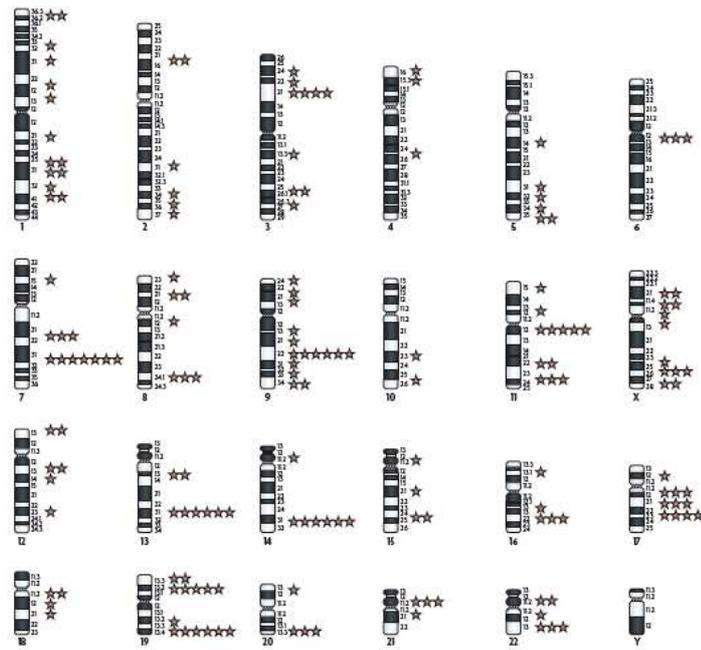


Figura 8. Localizzazione dei microRNA in CAGR (*cancer associated genome regions*) (da Croce CM, Nat Rev Genet 2009) .

Alterazioni nei livelli di espressione dei miRNA sono state documentate in diversi tipi di cancro, incluso il carcinoma del colon-retto, e tra questi spesso si annoverano i miRNA che hanno come bersaglio geni regolatori dello sviluppo del cancro come E2F e RAS (54, 55). A seconda del tipo di funzione biologica del miRNA, determinata dalle proteine che regola, si possono distinguere miRNA oncogeni (oncomiR) o miRNA onco-soppressori. (56, 57). I primi si trovano in regioni amplificate o sono sovraespressi nel tumore, e ciò determina un aumento della proliferazione cellulare, dell'angiogenesi, dell'invasività e una riduzione dell'apoptosi; i secondi si trovano in regioni delete o silenziate nel tumore e hanno un effetto biologico opposto. Esempi ben noti di oncomiR sono il miR-155 amplificato in molti tumori ematologici, tumore al polmone e al seno e il cluster miR-17-92 che comprende 6 geni per miRNA sovraespressi in tumori solidi e nel linfoma diffuso a larghe cellule B (Tabella 3). Tra i

miRNA oncosoppressori i più famosi si ricordano i miR-15a e miR-16-1, deleti nella leucemia linfocitica cronica, che hanno come bersaglio la proteina antiapoptotica BCL2, e la famiglia let-7, che reprime l'espressione dell'oncogene RAS (Tabella 4).

Table 1 | MicroRNAs that function as oncogenes or tumour suppressor genes in human cancers

MicroRNA	Dysregulation	Function	Validated targets	Oncogene (ONC) or tumour suppressor (TS)	Refs
miR-15a and miR-16-1	Loss in CLL, prostate cancer and multiple myeloma	Induces apoptosis and inhibits tumorigenesis	BCL2, WT1, RAB9B and MAGE83	TS	15,20,23, 30,52,69
let-7 (a, b, c, d, e, f, g and i)	Loss in lung and breast cancer and in various solid and haematopoietic malignancies	Induces apoptosis and inhibits tumorigenesis	RAS, MYC and HMGA2	TS	22,26, 42,70
miR-29 (a, b and c)	Loss in aggressive CLL, AML (11q23), MDS lung and breast cancers and cholangiocarcinoma	Induces apoptosis and inhibits tumorigenicity, Reactivates silenced tumour suppressor genes	TCL1, MCL1 and DNMT5	TS	30,64, 71,72
miR-34	Loss in pancreatic, colon, breast and liver cancers	Induces apoptosis	CDK4, CDK6, cyclin E2, EZF3 and MET	TS	56–58
miR-145	Loss in breast cancer	Inhibits proliferation and induces apoptosis of breast cancer cells	ERG	TS	31
miR-221 and miR-222	Loss in erythroblastic leukaemia	Inhibits proliferation in erythroblasts	KIT	TS	30
miR-221 and miR-222	Overexpression in aggressive CLL, thyroid carcinoma and hepatocellular carcinoma	Promotes cell proliferation and inhibits apoptosis in various solid malignancies	p27, p57, PTEN and TIMP3	ONC	43,51,73
miR-155	Upregulated in aggressive CLL, Burkitt's lymphoma and lung, breast and colon cancers	Induces cell proliferation and leukaemia or lymphoma in mice	MAF and SHIP1	ONC	32–34, 36,37
miR-17–92 cluster	Upregulated in lymphomas and in breast, lung, colon, stomach and pancreatic cancers	Induces proliferation	E2F1, BIM and PTEN	ONC	19,34,35, 40,41
miR-21	Upregulated in glioblastomas, AML (11q23), aggressive CLL and breast, colon, pancreatic, lung, prostate, liver and stomach cancers	Inhibits apoptosis and increases tumorigenicity	PTEN, PDCD4, TPM1 and TIMP3	ONC	31,37–39, 44–50
miR-372 and miR-373	Upregulated in testicular tumours	Promotes tumorigenicity in cooperation with RAS	LATS2	ONC	74

Tabella 4. Elenco di alcuni miRNA oncogeni e oncosoppressori e relativi tumori in cui sono coinvolti (da Croce CM, Nat Rev Genet 2009).

Sulla base delle caratteristiche sopra descritte, i miRNA possono essere considerati dei buoni *target* per la terapia anti-tumorale. Infatti l'introduzione del miRNA o dell'*antagomiR* nei tumori in cui questo è stato perso o risulta sovraespresso può portare all'arresto del ciclo cellulare e/o apoptosi, come dimostrato per alcuni tumori da esperimenti *in vivo* (58, 59). L'introduzione di queste molecole e la loro espressione può avvenire tramite vettori adenovirali, retrovirali o tramite la

coniugazione di oligonucleotidi con molecole lipofile e altri sistemi di *delivery*. Inoltre, per i tumori in cui si assiste a un silenziamento epigenetico di geni onco-soppressori non è difficile immaginare una terapia basata sull'introduzione di miRNA che controllano le DNMT (*Dna Methyl-Transferase*), come i membri della famiglia del miR-29 (60). Da numerosi studi di *profiling* su pazienti tumorali inoltre si è evidenziato come specifici set di miRNA sono associati al tessuto di origine (61) o a determinate caratteristiche isto-patologiche e di aggressività (62). E' quindi facile immaginare che alcuni miRNA, se supportati da forti evidenze epidemiologiche, potrebbero essere considerati dei biomarcatori ottimali utili nella stratificazione dei pazienti sia in fase diagnostica che prognostica.

1.6.2 MICRORNA COINVOLTI NEL CARCINOMA DEL COLON-RETTO

Attualmente, nello studio della connessione tra miRNA e CRC sono stati utilizzati due diversi approcci: lo studio funzionale e l'approccio tramite *profiling*. Tramite il primo approccio sono stati identificati i miRNA che regolano le *pathway* classicamente alterate nello sviluppo del tumore al colon-retto, come la *pathway* di Wnt/ β -catenina, PI-3-K, KRAS, P53 e la transizione mesenchima-epitelio (Figura 9).

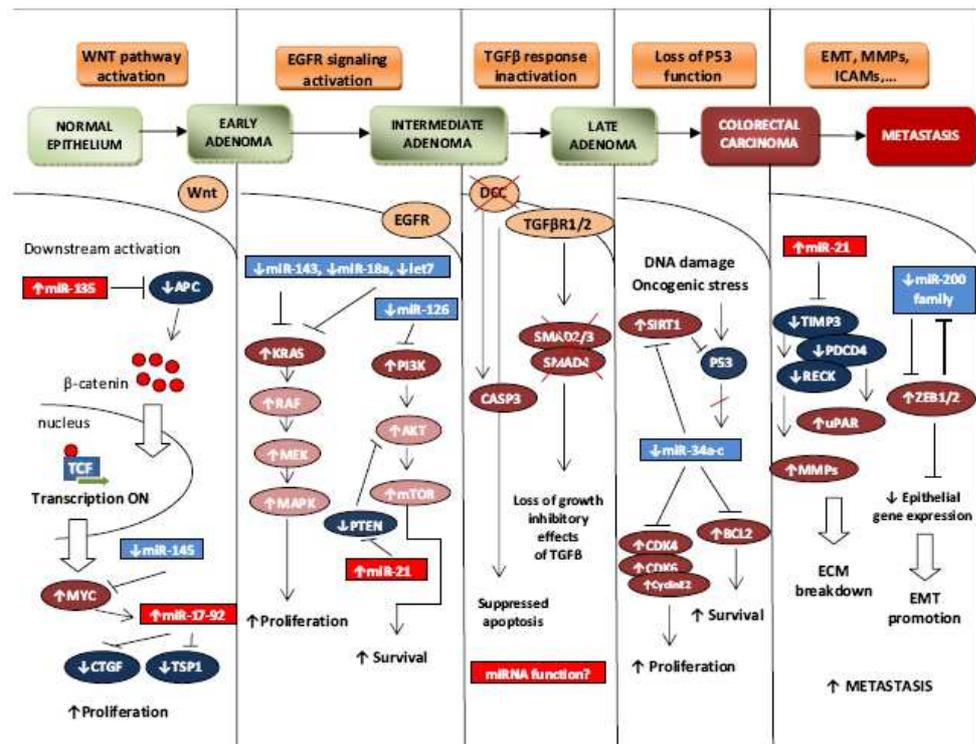


Figura 9. Pathways classicamente alterate nella progressione adeno-carcinoma e microRNA associati (da Slaby O et al., Molecular Cancer 2009).

L'approccio tramite *profiling*, sviluppato negli ultimi anni, si avvale di metodiche *high-throughput* (HT), e ha permesso inizialmente l'identificazione di numerosi geni di seconda classe come *markers* per il carcinoma del colon-retto; successivamente è stato applicato anche allo studio del trascrittoma dei miRNA, portando all'identificazione di nuovi putativi marcatori prognostici per questa malattia (54). Analisi condotte mediante l'utilizzo della tecnica dei *microarrays*, la *miRAGE* (*microRNA Serial Analysis of Gene Expression*) e la *Real Time PCR* (RT-PCR) hanno mostrato che gli schemi di espressione dei miRNA sono sistematicamente alterati in CRC. Nei primi lavori di questo tipo è stata comparata l'espressione dei miRNA tra linee tumorali oppure tra tessuti CRC e tessuti adiacenti normali (63, 64), evidenziando set molto estesi di

miRNA differenzialmente espressi. Nei lavori di *profiling* su pazienti invece ci si è focalizzati sulla ricerca dell'associazione tra un numero più ristretto di miRNA e gli stadi della malattia. Nel 2007 ad esempio, studiando l'associazione tra instabilità dei microsatelliti e espressione di miRNA/mRNA è stato trovato che 27 tra mRNA e miRNA, tra cui i miR-17-92, permettono di distinguere fenotipi MSI-H da MSS (65), mentre nel 2009 è stato trovato che i miR-31 e miR-592, sovraespressi in CRC rispetto al tessuto normale, sono correlati rispettivamente a tumori dMMR con sistema di riparazione dei *mismatch* inattivo (*Defective DNA Mismatch repair status*) o tumori pMMR con sistema di riparazione dei *mismatch* attivo (*Proficient DNA Mismatch repair status*, pMMR) (66). Questi e altri miRNA analizzati, infatti, si trovano in regioni cromosomiche soggette a controllo tramite metilazione e ciò spiegherebbe la loro associazione al fenotipo MMR. Nel 2008 un altro lavoro ha associato l'espressione di 17 miRNA a ricorrenza di CRC allo stadio II: tra questi il miR-320 e miR-498 sono correlati a una maggior probabilità di sopravvivenza senza ricaduta, mentre il miR-145, il meno espresso nel tumore, ha mostrato sopprimere *in vitro* la crescita tumorale (67). Tuttavia i dati su questo miRNA risultano contrastanti e legati alla capacità metastatica della linea analizzata poiché in linee metastatiche di CRC esso ha mostrato la proprietà opposta (68). Tra i *target* del miR-145 vi sono la proteina DFF-45 (DNA Fragmentation Factor 45), attivata dalla caspasi 3 durante l'apoptosi e responsabile della frammentazione della cromatina (69), la proteina STAT1 (controllata dalla *pathway* di JAK e MAPK) e YES, una chinasi oncogenica della famiglia Src (70).

In un altro studio effettuato su diverse coorti di pazienti a diversi stadi , è stato osservato che la sovraespressione di 5 miRNA, miR-20a, miR-21, miR-106a, miR-181b e miR-203 è associata a scarsa sopravvivenza nei pazienti affetti da CRC (71). Tra questi, il miR-21 è quello più fortemente deregolato: la sua sovraespressione, osservata già negli adenomi, aumenta nei carcinomi agli stadi più avanzati, dove è associata significativamente ad una prognosi sfavorevole. Ciò quindi può essere correlato alla progressione tumorale, in quanto il miR-21 può agire come agente antiapoptotico: tra i suoi *targets* vi sono infatti diversi geni oncosoppressori come PTEN, ed inoltre, la sua inibizione determina *in vitro* la riduzione della proliferazione cellulare ed *in vivo* la crescita tumorale (72). Di conseguenza, dal momento che il miR-21 è sovraespresso anche negli adenomi, che sono i precursori degli adenocarcinomi, questo potrebbe rappresentare un evento molecolare precoce nella progressione del tumore stesso (71). Anche la sovraespressione del miR-20a potrebbe presentare un analogo significato molecolare, dal momento che questo miRNA è parte del *cluster* policistronico miR-17-92, la cui sovraespressione incrementa *in vitro* la proliferazione cellulare ed è in grado di accelerare la formazione dei tumori *in vivo* (16). Un altro miRNA differenzialmente espresso in CRC è il miR-31, che presenta tra i suoi *targets* predetti i geni FOXC2 e FOXC3, dei fattori di trascrizione che agiscono come repressori dei geni coinvolti nell'apoptosi. In particolare, è stato osservato che la sua sovraespressione correla con lo stadio patologico del tumore: essa è infatti più elevata nei tumori allo stadio IV rispetto ai tumori allo stadio II, suggerendo che questo miRNA possa contribuire, oltre che alla tumorigenesi di

per sé, anche alla progressione tumorale ed alla acquisizione da parte del tumore di un fenotipo più aggressivo (64).

1.6.3 MICRORNA CIRCOLANTI NEL PLASMA

Sebbene la colonscopia per lo screening del cancro colo-rettale è attualmente lo strumento più affidabile per lo screening del CRC, la sua natura invasiva e il costo sostenuto ostacola un'ampia applicazione di questa procedura. D'altra parte il test del sangue occulto delle feci ha la limitazione di avere una bassa sensibilità e richiede restrizioni dietetiche meticolose. Per questo motivo è sorto un pressante bisogno di nuovi biomarcatori non invasivi per migliorare la rivelazione del CRC. Recentemente è stata osservata la presenza dei miRNA nel siero e nel plasma umano in diversi tipi tumorali quali colon, prostata, seno, polmone, ovaio e altri tipi (73, 74). Questi miRNA possono essere utilizzati come marcatori discriminanti non invasivi per la diagnosi del fenotipo tumorale. Al confronto con i test più comunemente usati attualmente, il *plasma test* è molto più vantaggioso perché non è richiesta una restrizione dietetica e neanche una collezione meticolosa di campioni fecali.

L'efficacia clinica dei miRNA come biomarcatori circolanti può essere inficiata da una serie di variabili come la raccolta dei campioni e l'elaborazione, l'efficienza di estrazione di RNA, nonché da altri aspetti tecnici coinvolti nel successo della qRT-PCR e nell'analisi dei dati; tuttavia, il corretto svolgimento di tutte le operazioni che vanno dalla raccolta del sangue all'analisi del dato di RT-PCR può permettere di ottenere risultati attendibili (75). I livelli dei

miRNA nel siero sono molto stabili e possono essere individuati mediante semplici prelievi di sangue. Infatti, i miRNA, che di per sé sono molecole in grado di resistere a cambiamenti di temperatura, quali quelli determinati da bollitura o congelamento, e a cambiamenti di pH, nel siero risultano essere anche protetti dall'attività delle RNAsi (73). E' stato dimostrato per alcuni tumori che i miRNA circolanti nel siero hanno origine tumore-specifica e ciò ha suggerito la possibilità di utilizzarli come nuovi biomarcatori molecolari non invasivi nella diagnosi precoce del cancro (76). Oltre a lavori di *profiling* generale su vari tipi di neoplasie mediante sequenziamento (73) o *microarray* (74), un lavoro del 2009 ha permesso di focalizzarsi sul confronto tra miRNA circolanti nel plasma di pazienti CRC e soggetti normali (77). In una prima fase, tramite RT-PCR, sono stati comparati i profili dei miRNA dal plasma di pazienti CRC e di controlli normali, nonché dei tessuti tumorali contro gli adiacenti tessuti normali nei pazienti CRC. Successivamente, i dati ottenuti nella fase precedente sono stati convalidati su un set di 90 pazienti CRC, 20 dei quali con il cancro gastrico, 20 con malattia infiammatoria intestinale (IBD) e 50 individui sani come controllo. Da questo lavoro è emerso che i miR-92 e miR-17-3p hanno elevati livelli nel plasma di pazienti CRC ($p < 0.0005$) rispetto ai pazienti normali, ed in particolare il miR-92 rappresenta un marcatore discriminante che permette di distinguere i pazienti affetti da CRC da quelli con cancro gastrico, con IBD e, infine, anche dai soggetti sani (77). Risultati simili sono stati ottenuti anche da Huang e collaboratori, che hanno dimostrato che i livelli dei miR-29a e miR-92 sono molto più elevati nel plasma di pazienti con carcinoma avanzato rispetto al plasma dei controlli normali (78). Ad oggi

tuttavia, nonostante il numero crescente di lavori su miRNA e plasma, mancano ancora dati di correlazione tra livelli di molecole circolanti e responsività a terapie o sopravvivenza dei pazienti, così come non sono stati individuati per nessun tumore miRNA circolanti stadio-specifici.

1.6.4 SILENZIAMENTO E RIPRISTINO DEI MICRORNA ALTERATI: UN FUTURO APPROCCIO TERAPEUTICO?

I miRNA possono essere utilizzati anche come *targets* terapeutici e come un potente strumento di intervento, poiché essi costituiscono una componente chiave della regolazione genica. La sovraespressione dei miRNA oncosoppressori in cellule che non li esprimono può essere indotta introducendo dall'esterno miRNA sintetici oppure specifici vettori lentivirali (58). Viceversa, i miRNA oncogenici possono essere silenziati utilizzando sia vettori che oligonucleotidi antisenso: gli “*antagomirs*” (analoghi sintetici dei miRNA) (79). La cross-sensibilità con i miRNA endogeni e la scarsa specificità per le cellule tumorali possono causare degli effetti collaterali non specifici durante la modulazione terapeutica dei miRNA, ma l'uso di un sistema di *delivery* efficace e di oligonucleotidi anti-miRNA sintetici poco tossici minimizza questi effetti indesiderati. Le terapie geniche possono essere progettate per trattare vari tumori, compreso il CRC, e per bloccare la progressione tumorale attraverso la manipolazione di miRNA oncosoppressori o oncogeni. In questo modo la manipolazione dei miRNA può controllare il tasso di crescita tumorale e può essere utilizzata come una nuova terapia sia negli stadi precoci di cancro sia in quelli avanzati.

Anche se gli esperimenti basati sulla terapia con i miRNA risultano apparentemente promettenti, è stato condotto finora solo un limitato numero di studi *in vivo* in animali modello. In uno di questi è stato dimostrato che il silenziamento del miR-17-5p tramite antagomir sopprime la crescita tumorale *in vivo* e *in vitro* tramite la sovraregolazione di P21 e BIM (79). Questo miRNA, così come altri, rappresenta quindi un esempio di *oncomiR* che può essere utilizzato come *target* nella terapia anti-tumorale.

1.7 SYSTEMS BIOLOGY

Sin dalla sua nascita, la biologia molecolare ha affrontato i fenomeni biologici principalmente attraverso lo studio della funzione di ogni singolo gene e/o proteina. Questo approccio è definito riduzionistico ed è di tipo *bottom > up*, poiché propone di ricostruire la struttura ed il funzionamento di un sistema estremamente complesso, come può esserlo una cellula, attraverso lo studio dettagliato di ogni singola reazione biochimica. L'approccio riduzionistico si è dimostrato per oltre un secolo estremamente fruttuoso, portando alla scoperta di un enorme numero di principi biologici. Tuttavia, nonostante il suo evidente successo, molti aspetti critici della biologia e della biomedicina sono rimasti irrisolti, soprattutto quando ci si è trovati a dover spiegare in maniera razionale fenomeni biologici estremamente complessi e di grande rilievo in ambito medico, come la senescenza cellulare, la trasformazione tumorale, l'apoptosi, le malattie complesse. Per analogia, se si volesse studiare un'automobile e ci si focalizzasse sull'identificazione del motore, delle cinture di sicurezza e dei fari

e si analizzassero le loro specifiche funzioni, alla fine non si riuscirebbe a comprendere come realmente il veicolo possa funzionare. Soprattutto, non si avrebbe alcuna idea di come poter riparare l'automobile in caso di guasto. Allo stesso modo, l'approccio tradizionale allo studio della biologia e della salute umana ha mostrato i suoi evidenti limiti quando ha tentato di comprendere problemi patologici complessi (eg, cancro, malattie degenerative) (80-82). Questi limiti di conoscenza sono dovuti al fatto che all'interno della cellula, contrariamente a quanto assunto dalla visione *bottom > up*, le molecole solo raramente sono responsabili di una funzione biologica discreta, ma, al contrario, interagiscono dinamicamente tra loro, in maniera integrata, coordinata e gerarchica (83, 84). Il risultato di queste complesse interazioni molecolari sono tutte quelle reazioni biochimiche che rendono possibile la vita di una cellula e di un organismo. Quindi l'approccio alla biologia moderna deve essere necessariamente di tipo olistico, sistemico (85). In altre parole, si passa da una visione *bottom > up* della natura ad una *top > down* (86), cioè lo studio inizia dal vertice del sistema e procede progressivamente verso la sua base, consentendo così il controllo della ricostruzione effettuata mediante l'approccio *bottom > up* (Figura 10).

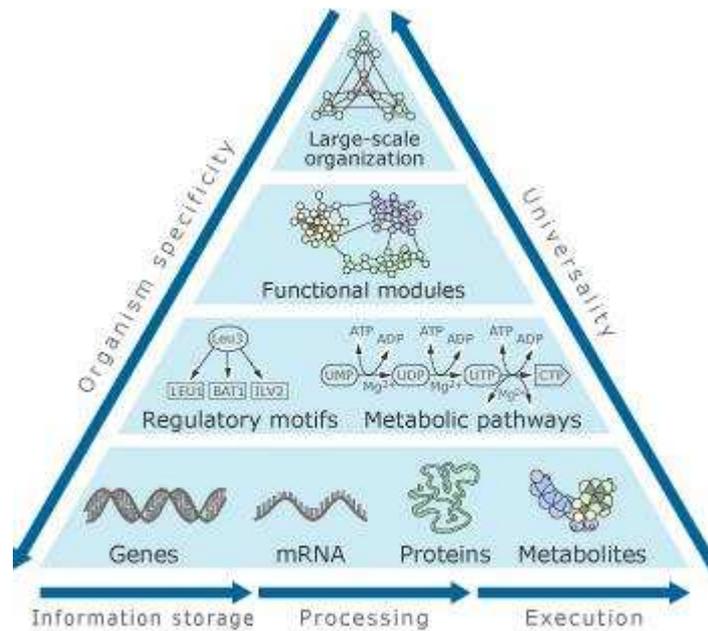


Figura 10. Struttura gerarchica dei sistemi Biologici

Sotto quest'ottica innovativa nasce la *Systems Biology* (Biologia dei Sistemi), cioè lo studio di un organismo, o di un apparato molecolare, visto come una *network* integrata e dinamica di geni e proteine che interagendo tra loro nello spazio e nel tempo permettono ad uno specifico sistema di funzionare (87-89). La *Systems Biology* ha come obiettivo spiegare la struttura, funzione, regolazione e sviluppo dei sistemi biologici combinando approcci sperimentali e computazionali.

Definizione di Sistema

Generalizzando il concetto, un Sistema potrebbe essere definito come un gruppo di elementi indipendenti ma interconnessi da relazioni fisiche e funzionali che si manifestano nelle attività e nel comportamento del sistema stesso. Questa visione statica ed artificiale di un sistema può essere resa più

verosimile, ed approssimabile al comportamento dei sistemi biologici, se consideriamo la natura estremamente dinamica nello spazio e nel tempo delle interazioni tra gli elementi del sistema. Questo dinamismo è la chiave di lettura per comprendere la plasticità e la complessità funzionale dei sistemi biologici. Spesso i confini di un sistema possono non essere chiaramente definiti o definibili, specialmente se si sta analizzando un organismo multicellulare. Comunemente i sistemi modello più studiati sono *Saccharomyces cerevisiae*, o certe popolazioni cellulari (eg, macrofagi), oppure macchinari molecolari all'interno di particolari tipi cellulari *steady state* ed in condizioni patologiche. Tutti i sistemi (biologici e non) sono caratterizzati da particolari proprietà che ne determinano struttura e comportamento.

(1) La **proprietà emergente**, cioè ogni singola funzione del sistema è il risultato delle interazioni delle parti del sistema stesso.

(2) La **robustezza**: è la capacità del sistema di mantenere la propria funzione biologica a dispetto di cambiamenti esterni, fluttuazioni o danni interni. La robustezza viene raggiunta attraverso sistemi di *back-up* o di *feed-back loops*. Tra i sistemi di *back-up* abbiamo la duplicazione genica o l'uso di *pathway* alternative (ad esempio la produzione di ATP, che può essere ottenuta tramite glicolisi o ciclo degli acidi tricarbossilici). Molto frequentemente al fine di mantenere costante la concentrazione di certi metaboliti o l'attività di certe proteine vengono selezionati circuiti di *feed-back* negativi; questi circuiti hanno anche il vantaggio di accelerare la risposta del sistema quando interviene un cambiamento (90).

Dall'esistenza dei sistemi di *back-up* deriva un'altra proprietà del sistema, al **ridondanza funzionale**, poiché questi elementi duplicati hanno anche la stessa funzione.

(3) La **modularità**: un sistema è costituito da sottosistemi (moduli) caratterizzati da una relativa indipendenza strutturale e in grado di funzionare autonomamente; ciò aumenta la robustezza del sistema e ne aumenta la "compattezza"

(5) Il **dinamismo**: il sistema è in grado di variare struttura ed attività nel tempo e nello spazio.

Struttura delle *network*

Strettamente connesso al concetto di sistema vi è il concetto di *network* ovvero un insieme di nodi collegati tra loro da connessioni. In un sistema biologico i nodi rappresentano le molecole (DNA, RNA, proteine, metaboliti), mentre le connessioni identificano le diverse interazioni molecolari (proteina-proteina, proteina-acido nucleico, proteina-metabolita).

Tra le *network* cellulari distinguiamo:

- *network* metaboliche
- *network* trascrizionali
- *network* di interazioni proteina-proteina

In tutti e tre i tipi di *network* le connessioni possono essere distrutte a causa di mutazioni e per questo motivo la struttura delle *network* tende a essere preservata attivamente durante il processo di selezione evolutiva. In termini matematici un numero definito di nodi e connessioni definisce un grafo. Si

distinguono grafi direzionati, in cui le connessioni sono visualizzate come frecce e grafi non direzionati in cui le connessioni vengono rappresentate come semplici linee. In un grafo ogni nodo è caratterizzato da un *degree*, che indica in numero di nodi a esso connesso. Si distinguono inoltre grafi random geometrici in cui la probabilità di connessione dipende dalla distanza geometrica nello spazio; grafi random di Erdos-Renyi, in cui i nodi possono connettersi indipendentemente dalla distanza geometrica e la maggior parte dei nodi hanno *degree* medio (distribuzione di Poisson) (Figura 11).

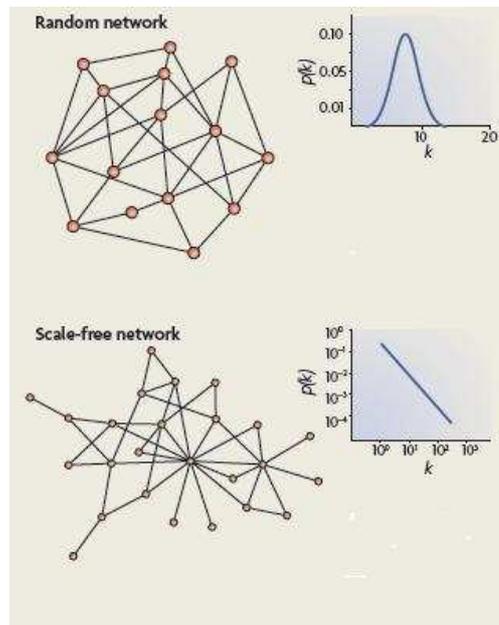


Figura 11. Topologie delle *network* e relative distribuzioni di probabilità del *degree* dei nodi. (da Yamada T et al., Nat Rev Mol Cell Biol 2009)

La maggior parte delle *network* biologiche di interazione proteina-proteina segue il modello *scale-free* e la distribuzione del *degree* dei nodi segue una distribuzione chiamata *power-law*

$$p(k) \sim k^{-\gamma}$$

dove k indica il numero di connessioni (ed è quindi ≥ 1), e γ è una costante compresa tra 2 e 3. Questa distribuzione di probabilità viene generalmente visualizzata in grafici log-log (Figura 11).

Il significato di questo modello è che in una *network scale-free* esistono molti nodi che hanno poche connessioni e pochi nodi che hanno molte connessioni (definiti *hubs*). Questa particolare legge rimane inalterata aumentando il numero di nodi della rete, indipendentemente dalla grandezza (scala) della rete; da qui il nome *scale-free* (91).

L'esistenza di questo tipo di *network* si spiega con il principio dell'attacco preferenziale (*preferential attachment*) secondo il quale un nuovo nodo (ad esempio una nuova proteina) tende a connettersi a nodi ad alto *degree* nella *network* (secondo il principio "The rich gets richer") (91).

Nelle *network* biologiche questo avviene attraverso la duplicazione genica, per cui una nuova proteina, omologa ad una pre-esistente, tende a interagire con gli stessi interattori della prima. E' stato osservato tuttavia che gli *hubs* sono soggetti meno frequentemente a duplicazioni, in quanto esiste una correlazione negativa tra connettività e *duplicability*, ma sono molto conservati e hanno un lento tasso evolutivo (92).

Un altro tipo di topologia molto comune nelle *network* metaboliche reali è quella *hierarchical*, in cui gli *hubs* rappresentano il centro di strutture modulari interne composte da nodi densamente connessi (Figura 12). La *network* quindi si accresce secondo repliche successive di tali **moduli**. In questo modo aumenta il *clustering* della *network*, ovvero la connettività tra i *neighbours* di un nodo.

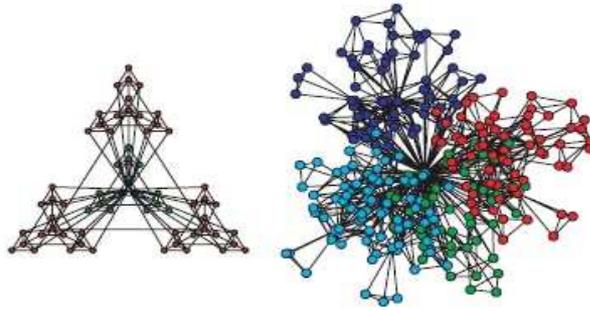


Figura 12. Struttura di un modulo e della *network* gerarchica (da Barabasi AL et al., Science 1999).

Gli *hubs* possono essere considerati la struttura portante di una *network* biologica, ma dall'altra parte ne rappresentano anche il “tallone d'Achille”. Se si verifica il danno ad un *hub*, vengono perse o alterate le numerose interazioni che lo riguardano e quindi la rete si sfalda e le normali attività del sistema vengono gravemente compromesse (93). Gli *hubs* rappresentano proteine chiave nell'insorgenza di certi fenotipi patologici complessi (eg, cancro), e conseguentemente per la loro centralità funzionale nei sistemi biologici umani rappresentano candidati bersaglio chiave nella terapia farmacologica (94,95) (Figura 13).

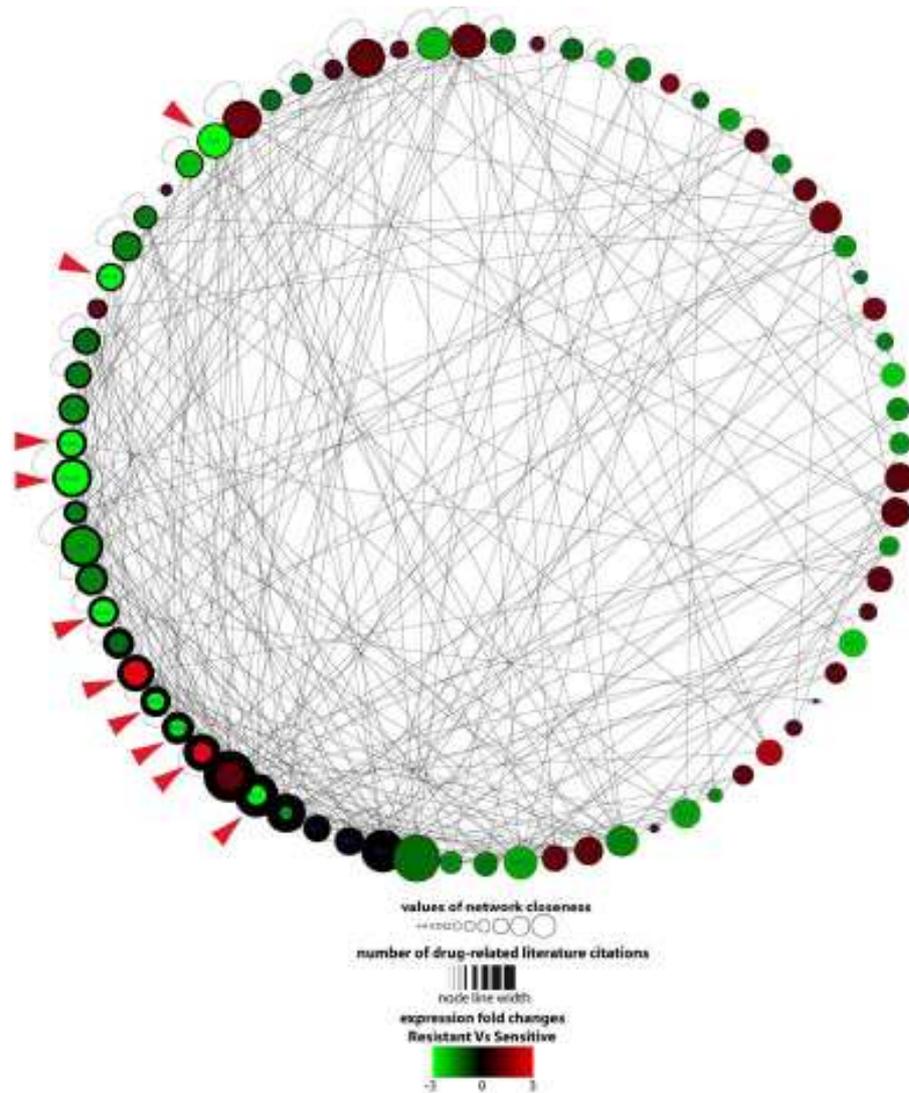


Figura 13. Correlazione tra centralità nella *network*, espressione e *targeting* terapeutico. Ogni nodo rappresenta un gene. I colori dei nodi indicano il fold change tra pazienti sensibili e pazienti resistenti, la grandezza indica il degree e lo spessore del del bordo la frequenza di *targeting* da parte di farmaci (da Ragusa et al, BMC Cancer 2010).

Un esempio può essere rappresentato dagli *hubs* del Macchinario Apoptotico (AM) come le proteine CASP3, CASP8, TRAF1, BCL2, MAPK1 e AKT1 (94). Dall'analisi da noi condotta in questo lavoro abbiamo dimostrato come gli *hubs* sono maggiormente colpiti da mutazioni o alterazioni del genoma, trascrittoma o proteoma in tutti e 14 i modelli tumorali da noi analizzati. Anche se molte delle alterazioni da noi evidenziate sembrano essere tumore-

specifiche, la disregolazione degli *hubs* all'interno della *network* dell'AM rappresenta un evento critico nella trasformazione tumorale. Inoltre, abbiamo dimostrato che proteine collegate ad *hubs* mutati hanno una maggior probabilità di essere trascrizionalmente alterati, dimostrando il ruolo diretto che essi hanno nel controllo dell'attività degli altri nodi della *network* (Figura 14).

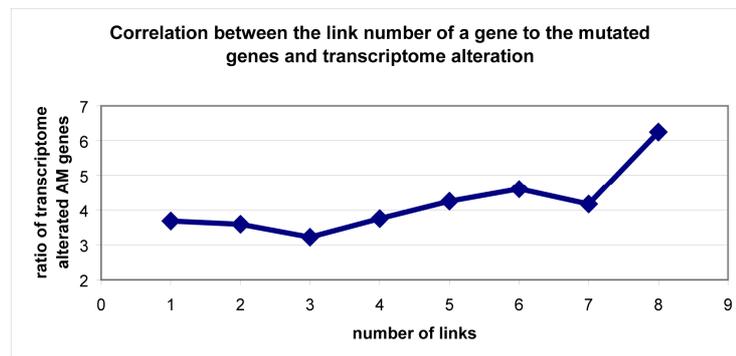


Figura 14. Grafico di correlazione tra *degreeness* a nodi mutati e alterazioni del trascrittoma/proteoma. All'aumentare del numero di interattori mutati aumenta la probabilità per un nodo di avere il trascrittoma o proteoma alterato (in assenza di mutazioni) (da Di Pietro et al., BMC Medical Genomics 2009)

Tuttavia, per comprendere appieno il funzionamento di un sistema biologico non è sufficiente conoscere le interazioni tra le molecole che ne fanno parte, ma bisogna integrare queste conoscenze con dati di altra natura (genomica, trascrittomica, proteomica, metabolomica) (96, 97). Ciò permette di ottenere informazioni su un sistema dinamico che si contrappone al sistema stazionario, in cui tutte le variabili rimangono costanti nel tempo (ad esempio concentrazioni di proteine ed mRNA). I sistemi biologici per eccellenza invece sono dinamici: infatti all'interno della cellula le molecole sono soggette a continui cambi di concentrazione nel corso del ciclo cellulare o in risposta agli stimoli o per effetto della compartimentalizzazione. Nel caso dei sistemi

biologici, lo *steady state* rappresenta solo “un’istantanea della cellula” ovvero la transizione tra uno stato e un altro. Il sistema biologico complesso per eccellenza è l’Uomo, tuttavia, a causa dei limiti tecnologici e concettuali che uno studio di tale complessità presenterebbe, si preferisce studiare sistemi biologici più discreti e definibili, come i complessi molecolari responsabili di un particolare fenomeno biologico. Recentemente sono stati pubblicati lavori in cui vengono prese in esame le *network* della metastatizzazione e delle malattie (98, 99). Nella *network* della metastatizzazione ogni nodo è rappresentato da un sito del tumore primario o delle metastasi e la lunghezza delle connessioni rappresenta la co-occorrenza tra due siti (Figura 15);

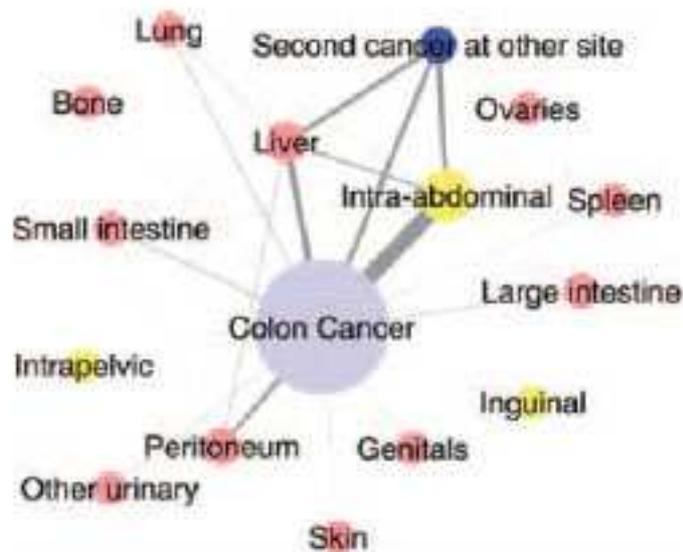


Figura 15. *Network* delle metastasi in CRC. I nodi corrispondono al sito anatomico delle metastasi, la grandezza alla loro incidenza. La lunghezza delle connessioni indica la frequenza di co-occorrenza tra 2 siti (da Chen LL et al., Br J of Cancer 2009).

gli autori asseriscono che essa può essere utile per effettuare previsioni di tipo retrogrado (cioè capire da quale sito primario provenisse il tumore) o

anterogrado (cioè prevenire futuri siti di metastasi). Questo e altri lavori fanno ben sperare nella possibilità di poter studiare in futuro il sistema-Uomo. Il lavoro qui presentato si pone all'interno della visione sistemica dei macchinari molecolari (come il macchinario apoptotico o il macchinario della trascrizione) e si propone di studiare la *network* trascrizionale dei miRNA in un modello, l'adenocarcinoma al colon-retto, sottoposto a terapia farmacologica con Cetuximab. I risultati sono stati pubblicati su *Molecular Cancer Therapeutic* (versione on-line 29 Settembre 2010)

2. MATERIALI E METODI

2.1 COLTURE CELLULARI

Per il nostro studio abbiamo utilizzato due linee cellulari di adenocarcinoma colo-rettale : le CaCo-2, KRAS wild-type e quindi sensibili e le HCT-116 che presentano KRAS mutato e sono quindi resistenti. Le CaCo-2 sono state coltivate in una miscela di E-MEM, con aggiunta di siero bovino fetale (FBS) al 20% e L-glutammina, penicillina/streptomicina e amminoacidi non essenziali (NEEA) a concentrazione finale dell'1%. Le HCT-116 sono state coltivate in McCoy's Medium, con aggiunta di siero bovino fetale (FBS) al 10% e L-glutammina e penicillina/streptomicina all'1%. Entrambe le linee cellulari sono state mantenute a 37°C con un percentuale di CO₂ pari al 5%.

2.2 ANALISI DELLA VITALITÀ CELLULARE DOPO TRATTAMENTO CON CETUXIMAB E PANITUMUMAB

In una prima fase dell'esperimento abbiamo sottoposto entrambe le linee cellulari (HCT-116 e CaCo-2) a trattamento con il Cetuximab (Erbix[®], Merck KGaA, Darmstadt, Germany) ed il Panitumumab (Vectibix[®], Amgen Europe B.V. Breda, Netherlands), per verificare quale dei due farmaci presentasse un effetto maggiore in termini di blocco della proliferazione sulle due linee, in un *time-course* a 4 punti (punto 0, 24h, 48h e 72h). A tale scopo

abbiamo allestito per ogni time-point una piastra da 96 pozzetti, seminando 5000 cellule per *well*. Ogni punto è stato fatto in triplicato secondo lo schema riportato in Tabella 5:

	1	2	3	4
A	HCT116 CNTRL	HCT-116 CETUXIMAB	HCT-116 PANITUMUMAB	bianco
B	HCT116 CNTRL	HCT-116 CETUXIMAB	HCT-116 PANITUMUMAB	bianco
C	HCT116 CNTRL	HCT-116 CETUXIMAB	HCT-116 PANITUMUMAB	bianco
D				
E				
F	CACO2 CNTRL	CACO-2 CETUXIMAB	CACO-2 PANITUMUMAB	bianco
G	CACO2 CNTRL	CACO-2 CETUXIMAB	CACO-2 PANITUMUMAB	bianco
H	CACO2 CNTRL	CACO-2 CETUXIMAB	CACO-2 PANITUMUMAB	bianco

Tabella 5. Schema della piastra da 96 *wells* utilizzata per l'analisi della vitalità.

Prima della somministrazione farmacologica le cellule sono state sottoposte a *serum starvation* (cioè eliminazione del siero dal terreno di coltura), allo scopo di bloccare la proliferazione cellulare. Abbiamo successivamente trattato le cellule con una concentrazione finale di Cetuximab e Panitumumab di 20 µg/ml a diversi *time points* (24, 48 e 72 ore). La valutazione della vitalità cellulare in seguito alla somministrazione dei due farmaci è stata effettuata mediante il saggio MTT, un saggio colorimetrico utilizzato per testare l'azione di farmaci, agenti citotossici ed altri prodotti che alterano la vitalità cellulare. Il principio del test si basa sulla capacità delle cellule metabolicamente attive di convertire il sale di tetrazolio (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl

tetrazolium bromide) o MTT, di colore giallo, in cristalli di formazano di color porpora. Il formazano viene quindi solubilizzato e la concentrazione viene calcolata in termini di densità ottica a 569 nm. Il livello di assorbanza è direttamente proporzionale al numero di cellule attive. I valori di assorbanza sono stati letti mediante il lettore di micropiastre *Multiscan Ascent*[®] ai tre differenti *time points* (24h, 48h e 72h); inoltre per ogni linea sono stati valutati i valori di assorbanza al $t=0$.

2.3 TRATTAMENTO FARMACOLOGICO CON CETUXIMAB

Per la successiva analisi molecolare abbiamo trattato le due linee cellulari con il Cetuximab (il farmaco che ha mostrato una maggiore attività di riduzione della vitalità cellulare) ad una concentrazione di 20 µg/ml, seguendo lo stesso *time-course* dell'esperimento delle micropiastre da 96 pozzetti. Per ogni *time-point* abbiamo seminato due fiasche da 75cc, una per il trattato ed una per il relativo controllo, con 1.5×10^6 cellule per fiasca, secondo lo schema illustrato in (Tabella 6). L'intero esperimento è stato ripetuto in triplicato. L'RNA totale dalle linee è stato estratto mediante l'utilizzo del TriZol[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) secondo il protocollo fornito dal kit.

	24h	48h	72h
CACO2 TRATTATO	1 fiasca 75cc	1 fiasca 75cc	1 fiasca 75cc
CACO2 CONTROLLO	1 fiasca 75cc	1 fiasca 75cc	1 fiasca 75cc
HCT116 TRATTATO	1 fiasca 75cc	1 fiasca 75cc	1 fiasca 75cc
HCT116 CONTROLLO	1 fiasca 75cc	1 fiasca 75cc	1 fiasca 75cc

Tabella 6: Schema dell'esperienza per il trattamento farmacologico delle due linee cellulari con Cetuximab.

2.4 CAMPIONI DI TESSUTO PARAFFINATO

Tutti i campioni umani utilizzati in questo lavoro sono stati raccolti nell'ambito di attività di assistenza clinica standard. I campioni CRC provenienti da 25 pazienti, fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE, Formalin-Fixed Parafin-Embedded) sono stati forniti dall'Unità di Anatomia Patologica dell'Azienda Policlinico dell'Università di Catania. Essi sono stati analizzati in conformità con le politiche del Comitato di Controllo Istituzionale dell'ospedale. Tutti i campioni provengono da resezione chirurgica ed è stata fatta la verifica istopatologia del fenotipo neoplastico.

Per l'isolamento dell'RNA e del DNA sono state ottenute fettine dello spessore di 20 µm. Il DNA e l'RNA totale dei campioni FFPE sono stati estratti mediante l'utilizzo dei kit QIAamp DNA Kits (Qiagen, Hilden Germany) e RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion, Applied Biosciences, Austin, TX), rispettivamente, secondo il protocollo fornito dal kit.

2.5 REAL-TIME PCR

La *Real Time PCR*, denominata anche PCR quantitativa, è un metodo di amplificazione e quantificazione simultanee del DNA: essa misura l'amplificazione in tempo reale durante la fase esponenziale della PCR, quando cioè l'efficienza dell'amplificazione è influenzata minimamente dalle variabili di reazione. Piuttosto che rilevare l'ammontare totale del prodotto amplificato alla fine dei cicli di PCR, i prodotti della reazione vengono determinati a partire dal ciclo di in cui l'amplificato diventa rilevabile, definito ciclo soglia (C_T), permettendo di ottenere risultati molto più accurati rispetto alla PCR tradizionale *end point* (Figura 16).

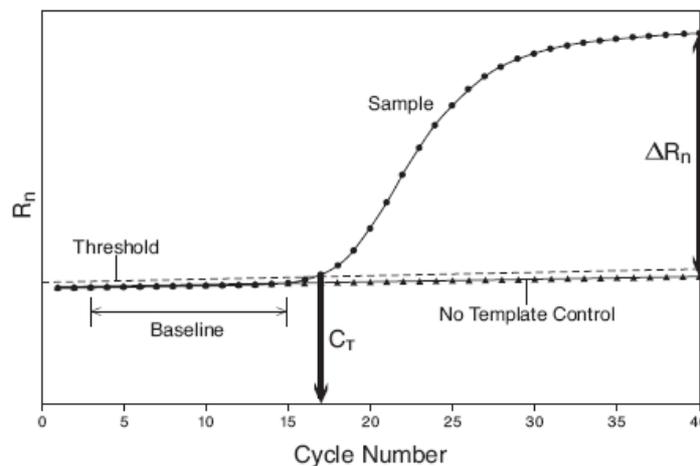


Figura 16 Tipica curva di amplificazione di una PCR. Il ciclo soglia (C_T) è rappresentato dall'intersezione della linea di *threshold* con la curva di amplificazione (da TaqMan Gene Expression Master Mix Protocol).

Più elevato è il numero di copie iniziali della sequenza da amplificare, più basso sarà il C_T . Il diagramma di C_T su DNA stampo è lineare, e la pendenza della retta (*slope*) fornisce una misura dell'efficienza della PCR. Alcuni strumenti forniscono dati relativi alle curve di dissociazione o di *melting* che

seguono il completamento della PCR: questi dati danno un'indicazione sulla purezza del prodotto di reazione e rivelano la presenza di eventuali dimeri di *primers*.

La *Real Time PCR* prevede due metodi di quantificazione del prodotto amplificato: una quantificazione assoluta ed una quantificazione relativa. La quantificazione assoluta richiede l'utilizzo di campioni di cui sia nota la concentrazione assoluta e il numero di copie di DNA o RNA presenti, che vengono utilizzati per costruire una curva *standard*; interpolando i valori di C_t del campione in esame sulla curva *standard* è possibile ottenere un valore quantitativo preciso in termini di numero di copie. La quantificazione relativa è utilizzata per analizzare cambiamenti nell'espressione di un gene in un dato campione in relazione ad un campione di riferimento (definito calibratore); in questo caso non è necessaria la costruzione di una curva *standard*: gli *unknown* vengono quantificati paragonando il loro ΔC_t con quello del calibratore.

La quantificazione dell'amplificato viene effettuata mediante la rilevazione della fluorescenza che si genera durante la PCR per effetto di diverse possibili reazioni chimiche. Le chimiche principali sono basate sul legame di coloranti fluorescenti che si intercalano nella doppia elica del DNA, come il SYBR green, o sull'ibridazione di sonde specifiche.

2.5.1 QUANTIFICAZIONE MEDIANTE IL SAGGIO TaqMan

Le sonde TaqMan sono sonde ad ibridazione, specifiche per il frammento di interesse, marcate con molecole fluorescenti; si tratta di oligonucleotidi che, come i *primers* della PCR, vengono disegnati per essere complementari alla sequenza bersaglio da amplificare. La sonda è disegnata in modo da ibridarsi all'interno del frammento amplificato nella reazione di PCR (Figura 17).

Il principio della reazione si basa sull'utilizzo di una sonda costituita da un oligonucleotide che contiene all'estremità 5' un marcatore fluorescente chiamato *reporter* e al 3' un *quencher* (un gruppo colorante in grado di mascherare l'emissione luminosa). Quando colpita dalla luce, la molecola fluorescente in 5' trasferisce energia al *quencher* il quale determina una inibizione della fluorescenza del substrato. Durante il processo di amplificazione l'attività esonucleasica 5'-3' della Taq-polimerasi scalza la sonda determinando la separazione del *reporter* dal *quencher*, con una conseguente emissione di fluorescenza (Figura 17).

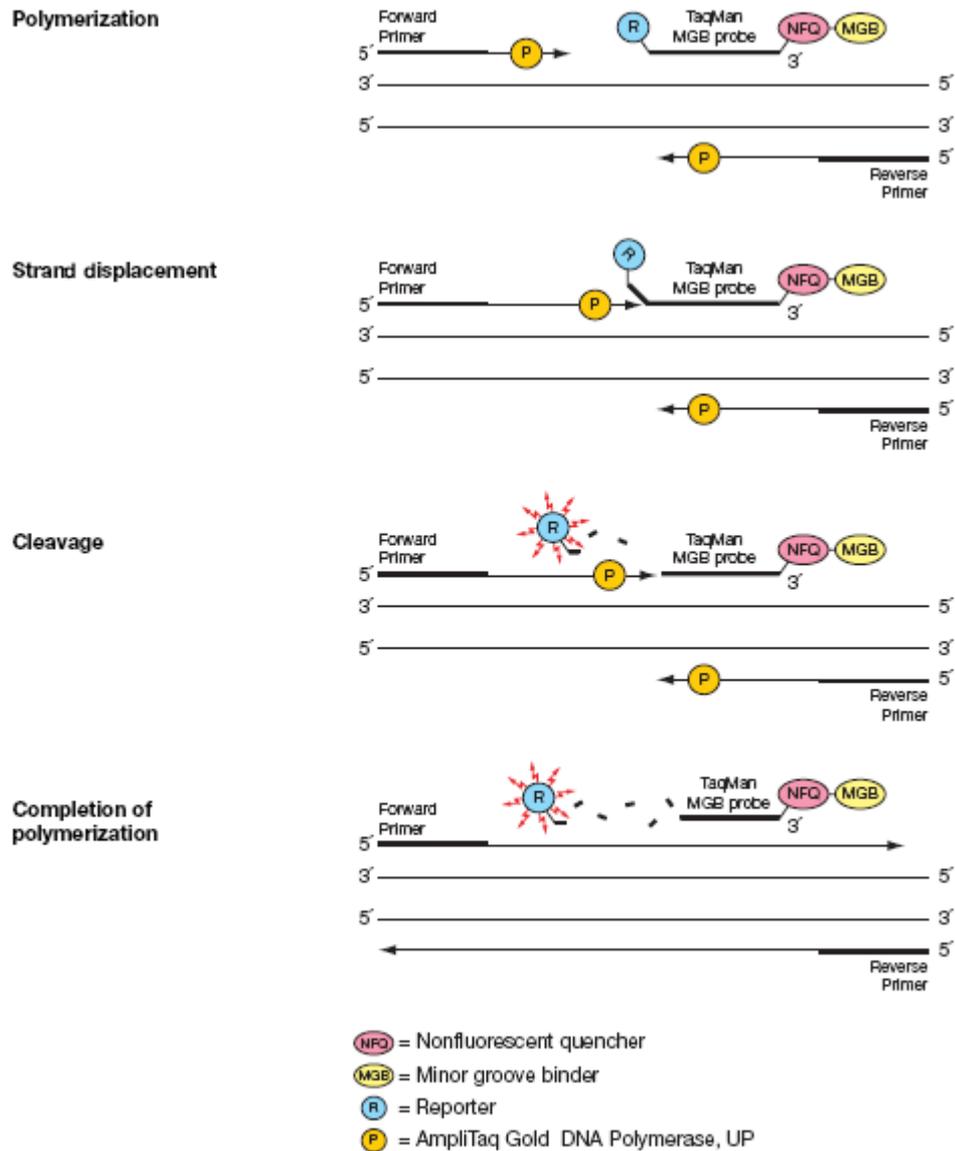


Figure 2 The 5' nuclease assay

Figura 17. Meccanismo di rilevazione del segnale fluorescente mediante le sonde *TaqMan*: la vicinanza tra *quencher* e *reporter* impedisce l'emissione della fluorescenza; il segnale viene emesso dal *reporter* solo in seguito alla digestione della sonda da parte della polimerasi durante l'estensione (da *TaqMan Gene Expression Master Mix Protocol*, Applied Biosystem).

2.6 ANALISI DEL TRASCRIPTOMA DEI microRNA IN LINEE CRC MEDIANTE TAQMAN® HUMAN MICRORNA ARRAY.

L'analisi del trascrittoma di 667 miRNA umani è stata effettuata su entrambe le linee su punti a 24h a 48h (trattati e relativi controlli), che in seguito a trattamento farmacologico sono risultato i più interessanti in quanto l'effetto di riduzione della vitalità cellulare è più marcato rispetto al punto a 72h.

Per l'analisi del trascrittoma abbiamo sfruttato la tecnologia delle *TaqMan® Low Density Array* (TLDA) (Applied Biosystem, Foster City,CA) (Figura 18), delle *micro-fluidic cards* da 384 pozzetti che permettono di effettuare fino a 384 reazioni simultanee di *Real-Time PCR* sfruttando la tecnologia delle sonde TaqMan.

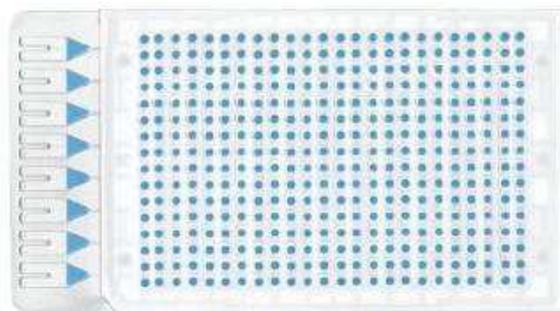


Figura 18 Applied Biosystems 7900HT Micro Fluidic Card.

Nel nostro esperimento, abbiamo utilizzato il sistema *TaqMan® Human MicroRNA Array v2.0* (Applied Biosystems), che consente la quantificazione simultanea di 667 miRNA umani tramite la metodica *TaqMan® MicroRNA Assays*. I microRNA sono distribuiti in 2 tipi di *cards*: le *cards* del pannello A contengono 377 microRNA a ampio interesse scientifico perchè aventi

funzione nota e/o ampiamente espressi; le *cards* del pannello B contengono 288 microRNA rari e meno studiati perché hanno funzione sconosciuta o sono poco espressi (Figura 19).

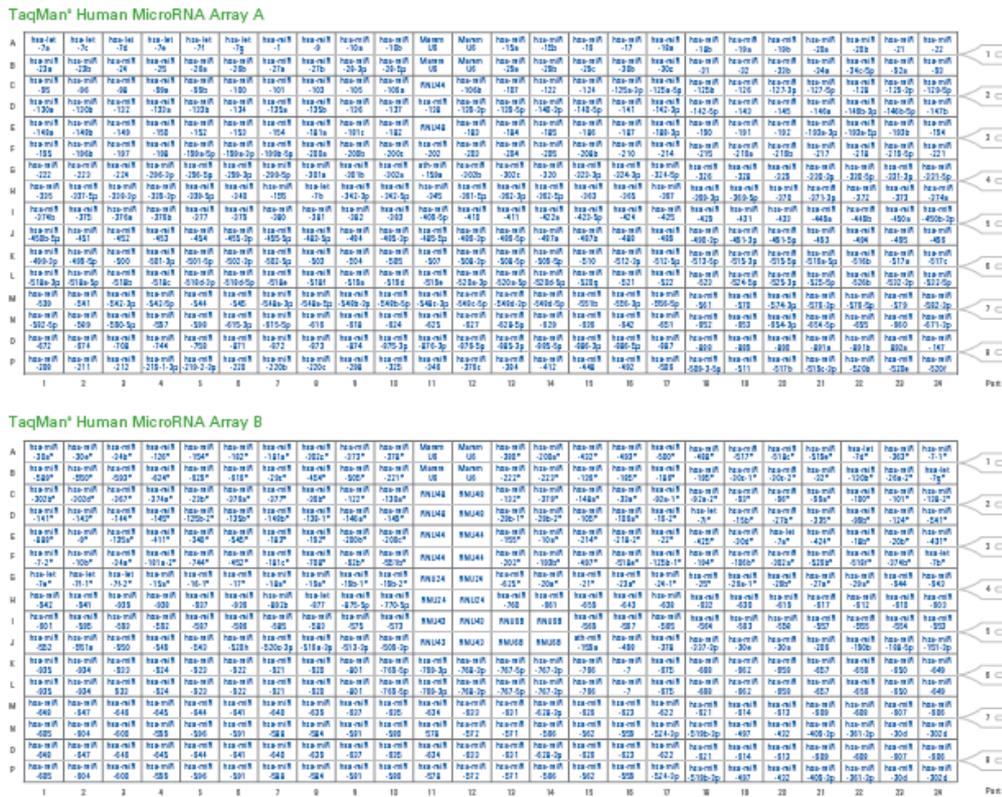


Figura 19: Schema e disposizione delle sonde TaqMan all'interno del *TaqMan® Human MicroRNA Array v.2* (Panel A, sopra; Panel B; sotto)

Nella *cards* sono inoltre inclusi i controlli endogeni positivi che servono per la normalizzazione dei dati: nella *card A* ci sono 3 tipi di controlli (4 replicati per il saggio U6, ed un singolo saggio di controllo rispettivamente per RNU44 ed RNU48); nella *card B* ci sono 6 controlli (U6, U48, U44, U46, U24 e U6B ognuno in quadruplicato).

In entrambe le *cards*

caricamento, ognuno dei quali è connesso a 48 pozzetti contenenti altrettante sonde (Figura 19).

Nella prima fase dell'analisi molecolare è stata effettuata la retrotrascrizione dell'RNA totale estratto dalle linee CRC (Figura 20 e Figura 21). Sono stati retrotrascritti 1000 ng di RNA totale utilizzando *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit* ed i *primers* per l'RT *Megaplex™ RT Primers, Human Pool A* e *Pool B* (Applied Biosystems), un pool di *primers forward* e *reverse* gene-specifici in grado di effettuare nel complesso l'RT dei miRNA contenuti in ogni pannello.

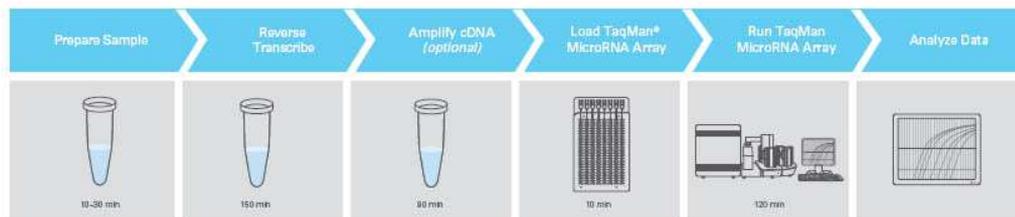


Figura 20. Workflow dell'esperimento per l'analisi del trascrittoma dei miRNAs con *TaqMan® Human MicroRNA Array v.2*

La reazione è stata condotta in una *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems), alle seguenti condizioni di reazione:

Stage	Temp	Time
Cycle (40 Cycles)	16 °C	2 min
	42 °C	1 min
	50 °C	1 sec
Hold	85 °C	5 min
Hold	4 °C	∞

I campioni di cDNA ottenuti sono stati utilizzati per l'analisi del trascrittoma dei miRNA in *Real Time PCR*. 6 µl di campione sono stati diluiti in 444 µl di

H₂O, quindi miscelati con 450 µl di *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems) e caricati negli otto canali di una *TaqMan® Human MicroRNA Array v2.0 card* (Applied Biosystems) (Figura 20 e Figura 21). La reazione è stata condotta in una *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) alle seguenti condizioni di reazione:

Step	AmpliTaq Gold Activation	PCR	
	HOLD	CYCLE (40 cycles)	
		Denature	Anneal/Extend
Temperature	95 °C	95 °C	60 °C
Time	10 min	15 sec	1 min

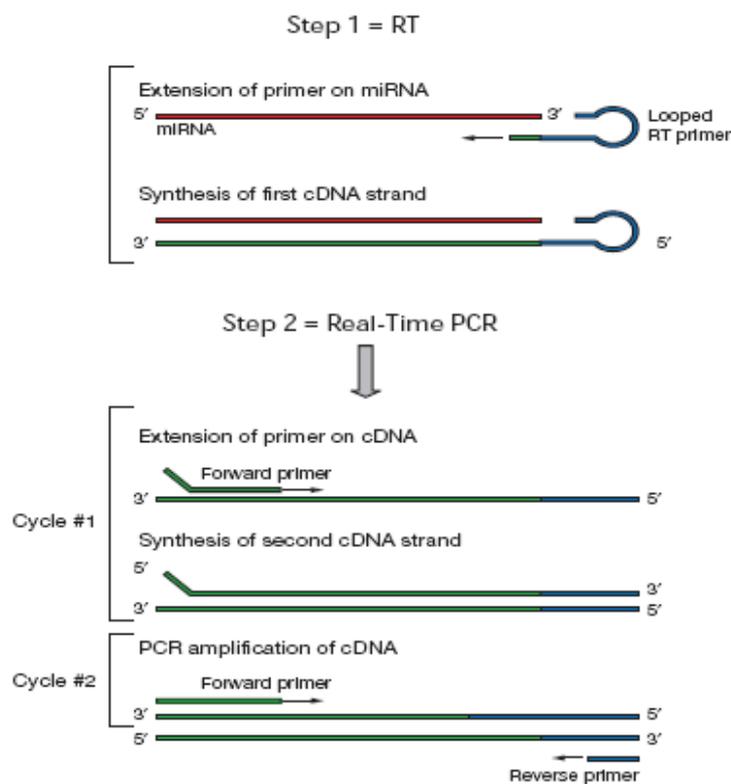


Figura 21. Reazione in due *steps* per la quantificazione dei miRs maturi (da *TaqMan MicroRNA Assay Protocol*, Applied Biosystem).

2.7 ANALISI DEI DATI DI ESPRESSIONE

Abbiamo applicato due diversi metodi per la normalizzazione dei dati. In primo luogo, abbiamo calcolato i livelli relativi di espressione miRNA attraverso il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ tramite il software *RQ Manager 1.2* (Applied Biosystem): la normalizzazione dei dati è stata effettuata utilizzando snRNA U6 e U48 snoRNA come controlli endogeni, dato che i loro valori di Ct sono risultati i più costanti in tutti i campioni da noi analizzati. Il calcolo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ viene effettuato secondo la seguente formula:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{campione}} - \Delta Ct_{\text{calibratore}}$$

Il ΔCt del campione è la differenza tra valore di Ct del gene target e il valore di Ct del controllo endogeno (U6 o U48) nel campione in analisi. Il ΔCt del calibratore è invece valore Ct del gene target e il valore di Ct del controllo endogeno (U6 o U48) nel calibratore (cioè il controllo non trattato o le HCT-116 nel confronto fra linee). I valori di Ct maggiori di 35 sono stati trattati come 35, mentre i valori di Ct *undetermined* (indeterminato) stati trattati come 40. Abbiamo accettato come attendibili solo i valori di fold change concordanti in entrambi i controlli endogeni. I dati di espressione nella sezione Risultati sono mostrati come logaritmo naturale (ln) della quantità relativa (RQ) di miRNA, normalizzato con snRNA U6 e rispetto a un campione calibratore (il corrispondente controllo non trattato di quel *time-point*). Abbiamo confrontato i livelli di espressione di miRNA in entrambe le linee cellulari dopo il trattamento e allo *steady-state*, utilizzando i controlli appaiati dello stesso *time-point* e usando come calibratore le HCT-116. Per identificare i miRNA

differenzialmente espressi (DE miRNA), abbiamo applicato il *paired t-test* (o *t-test t between subjects* nel confronto tra le linee) tra ΔCt utilizzando i seguenti parametri: assunzione di varianza uguale; Alpha (valore di p-value fuori soglia) = 0.01; il p-value è stato calcolato basandosi su permutazione e la significatività è stata determinata dopo la correzione di Bonferroni.

Abbiamo considerato come up-regolati o down-regolati quei geni che hanno un \ln della quantità relativa (RQ) almeno ≥ 1 e ≤ -1 , rispettivamente. Abbiamo inoltre escluso come DE miRNA quelli aventi Ct indeterminato o $Ct > 35$ o nel campione o nel calibratore, in quanto in tali casi la loro quantificazione relativa sarebbe potuta essere fuorviante. Abbiamo anche effettuato una normalizzazione secondo il metodo della *Global Median Normalization* (GMN: similmente all'analisi per i microarray, ciascuno dei valori di Ct del campione sono stati normalizzati rispetto alla mediana del Ct della matrice (100)). I dati di GMN sono mostrati come \ln della quantità relativa (RQ) del microRNA normalizzato rispetto al campione calibratore. Le matrici con i dati circa l'abbondanza relativa di miRNA in linee cellulari, prima e dopo il trattamento, sono stati ottenuti con MeV04 (<http://www.tm4.org/mev.html>).

2.8 DETERMINAZIONE DELLA MUTAZIONE DI KRAS E ANALISI DI ESPRESSIONE DEI MICRORNA IN CAMPIONI PARAFFINATI DI PAZIENTI CRC.

Lo stato mutazionale del gene KRAS in campioni CRC inclusi in paraffina è stato valutato mediante discriminazione allelica (AD, *allelic discrimination*) in Real-Time PCR. La discriminazione allelica è un saggio multiplex in end-point

PCR che identifica le varianti nucleotidiche di un *single-nucleic polymorphism* (SNP). La presenza di 2 coppie di primers e relative sonde in ciascuna reazione permette la genotipizzazione del campione. Per ciascun saggio AD vengono usate 2 sonde *TaqMan MGB* (Applied Biosystem) che identificano un singolo SNP: una sonda, marcata con il fluorocromo VIC identifica l'allele 1 (ad esempio il wild-type), l'altra, marcata con il fluorocromo FAM identifica l'allele 2 (ad esempio il mutato). I campioni ignoti verranno quindi classificati in omozigoti per l'allele 1 se la fluorescenza emessa sarà solo quella del VIC; oppure omozigoti per l'allele 2 se la fluorescenza emessa sarà solo quella del FAM; oppure eterozigoti se hanno entrambe gli alleli ed entrambe le fluorescenze verranno emesse (Figura 22).

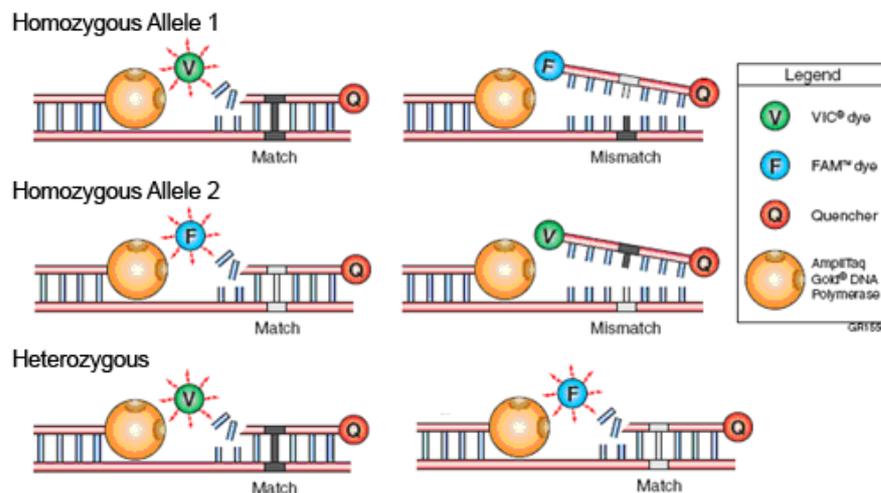


Figura 22. Meccanismo di identificazione dei SNP mediante discriminazione allelica con sonde *TaqMan*® MGB.

Il DNA di ogni campione è stato analizzato con sette diversi saggi *TaqMan*® MGB personalizzati (Applied Biosystems, USA), discriminando le sette mutazioni più comuni nei codoni 12 e 13 del KRAS (30). Ogni test è stato

eseguito in duplice copia, utilizzando i controlli negativi e positivi per ogni mutazione. Abbiamo anche analizzato il genotipo KRAS nelle linee cellulari Caco-2 e HCT-116 da noi utilizzate in laboratorio, per confermare rispettivamente l'assenza e la presenza della mutazione.

Per i 25 campioni CRC inclusi in paraffina è stata effettuata la quantificazione di 9 miRNA scelti sia tra i DE miRNA che tra quelli che non risultavano sovra-espresi o sotto espressi, al fine di confermare i dati ottenuti sulle linee e verificare la robustezza dell'analisi. 100 ng di RNA totale sono stati retrotrascritti utilizzando *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit* con dei primers a *stem loop* specifici per i miRs maturi e alle seguenti condizioni di reazione: 16°C x 30'; 42°C x 30', 85°C x 5'. Successivamente 20 ng del cDNA ottenuto sono stati amplificati in una *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystem) con *TaqMan MicroRNA Assay* e *TaqMan Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystem). Ogni saggio è stato eseguito in triplice copia, utilizzando snRNA U6 come controllo endogeno. L'espressione differenziale di miRNA in pazienti con KRAS wild-type e mutato è stata valutata mediante il test di Wilcoxon-Mann-Whitney (o test della somma dei ranghi ($p < 0.05$)).

2.9 PREDIZIONE DEI TARGETS E ANALISI DELLE *GENE ONTOLOGIES*

I *targets* dei DE miRNA predetti o sperimentalmente validati sono stati estratti da miRecords (<http://mirecords.biolead.org>). La predizione è stata ritenuta

attendibile se il *target* veniva identificato da almeno 6 *tools* (o in mancanza di risultati da 5 o 4) di predizione tra gli 11 possibili.

Al fine di migliorare la previsione dei *targets*, abbiamo utilizzato anche dati di anticorrelazione dell'espressione tra miRNA e mRNA o miRNA e proteine (se disponibili) (101, 102) (<http://discover.nci.nih.gov/cellminer/home.do>). Questo ulteriore filtro è stato ottenuto anche utilizzando il database Hoctar (<http://hoctar.tigem.it>), per i miRNA intronici ricercando l'anticorrelazione tra il target e il gene ospite. Per verificare la correlazione negativa fra miRNA e mRNA è stato utilizzato il test di correlazione di Pearson prendendo come significativi i valori di r che davano un $p\text{-value} < 0.05$. La classificazione funzionale delle *Gene Ontology* (GO) dei *targets* è stata effettuata utilizzando il plug-in di cytoscape BINGO (<http://www.psb.ugent.be/cbd/papers/BiNGO/Home.html>). L'analisi delle GO statisticamente differenti tra i diversi *time points* è stata effettuata utilizzando il tool FatiGO, disponibile nella suite di Babelomics (<http://babelomics3.bioinfo.cipf.es>).

2.10 ANALISI GENOMICA COMPUTAZIONALE

Le informazioni sulla posizione genomica dei miRNA umani e la loro assegnazione a specifiche famiglie sono state estratte da CoGeMiR (<http://cogemir.tigem.it>). I cluster di miRNA sono stati invece ottenuti da Mirgen (<http://www.diana.pcbi.upenn.edu/miRGen.html>) e includono geni con distanza massima di 5000 bp. Per valutare la presenza di meccanismi di regolazione comune nei cluster o nelle famiglie, abbiamo esaminato la

relazione tra la vicinanza genomica dei pre-miRNA e la loro comune espressione, mettendo a confronto le posizioni genomiche di pre-miRNA e i loro valori di espressione. I fattori di trascrizione (TF) comuni ai DE miRNA sia predetti sulla base della conservazione evolutiva dei siti di legame al DNA (*Transcription Factor Binding Site*, TFBS) sia sperimentalmente validati sono stati ottenuti da 3 differenti database: TransMir (<http://202.38.126.151/hmdd/mirna/tf/>), PuTmir ([http://www.isical.ac.in/~bioinfo_miu / TF-miRNA.php](http://www.isical.ac.in/~bioinfo_miu/TF-miRNA.php)) e mirGen 2.0 (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/mirgen/>). Come per quella dei *targets*, la previsione del TF è stata migliorata verificando la correlazione (negativa o positiva) di espressione per le coppie miRNA / TF. Il set di dati da microarray utilizzato per questa analisi e i test statistici applicati sono stati gli stessi di quelli descritti per la previsione dei *targets*.

2.11 ANALISI DELLE NETWORK

Le *network* biologiche dei geni *target* dei DE miRNA sono state costruite recuperando i corrispondenti dati di interattoma attraverso plug-in APID2NET (<http://bioinfow.dep.usal.es/apid/apid2net.html>) di Cytoscape: esse contengono i *targets* validati dei DE miRNA, quelli predetti e filtrati tramite l'analisi di anticorrelazione e i loro primi interattori. L'analisi dei parametri di centralità della *network* è stata effettuata utilizzando il plug-in Network Analyzer (<http://med.bioinf.mpi-inf.mpg.de/netanalyzer>). I dati sulla relazione funzionale tra i *targets* e farmaci utilizzati nel trattamento del CRC sono stati estratti dai database PharmGKB (<http://www.pharmgkb.org/index.jsp>) e

Comparative Toxicogenomics Database (<http://ctd.mdibl.org/>), mentre le informazioni sul loro coinvolgimento nel cancro dal database Functional Census of Human Cancer Genes (<http://bioinfo.hrbmu.edu.cn/fcensus/Home.jsp>). Infine i dati relativi alla disregolazione dei miRNA in altre malattie umane sono stati ottenuti dal database miR2Disease (<http://www.mir2disease.org>) e dalla letteratura.

3. RISULTATI

3.1 DIFFERENTE SENSIBILITÀ DELLE CELLULE DI CANCRO AL COLON AL CETUXIMAB E PANITUMUMAB

Per testare la sensibilità delle linee cellulari di CRC al Cetuximab e al Panitumumab è stata analizzata la vitalità delle due linee cellulari CaCo-2 (con KRAS wild type) e HCT-116 (con KRAS mutato), rispettivamente sensibile e resistente, in un *time course* di 72h dopo trattamento farmacologico usando il saggio MTT. Come mostrato in Figura 23a sia il Cetuximab e che il Panitumumab hanno un evidente effetto negativo sulla vitalità della linea cellulare CaCo-2: per entrambi gli inibitori dell'EGFR l'effetto è tempo-dipendente. Per contro, il saggio MTT ha mostrato che entrambi i farmaci non hanno un effetto apprezzabile sulla vitalità della linea cellulare HCT-116 (Figura 23b). La scelta di analizzare gli effetti del Cetuximab sull'espressione dei miRNA è stata motivata dal fatto che esso risulta essere il più utilizzato in ambiente clinico e per il fatto di avere effetti differenti e più marcati nelle due linee cellulari.

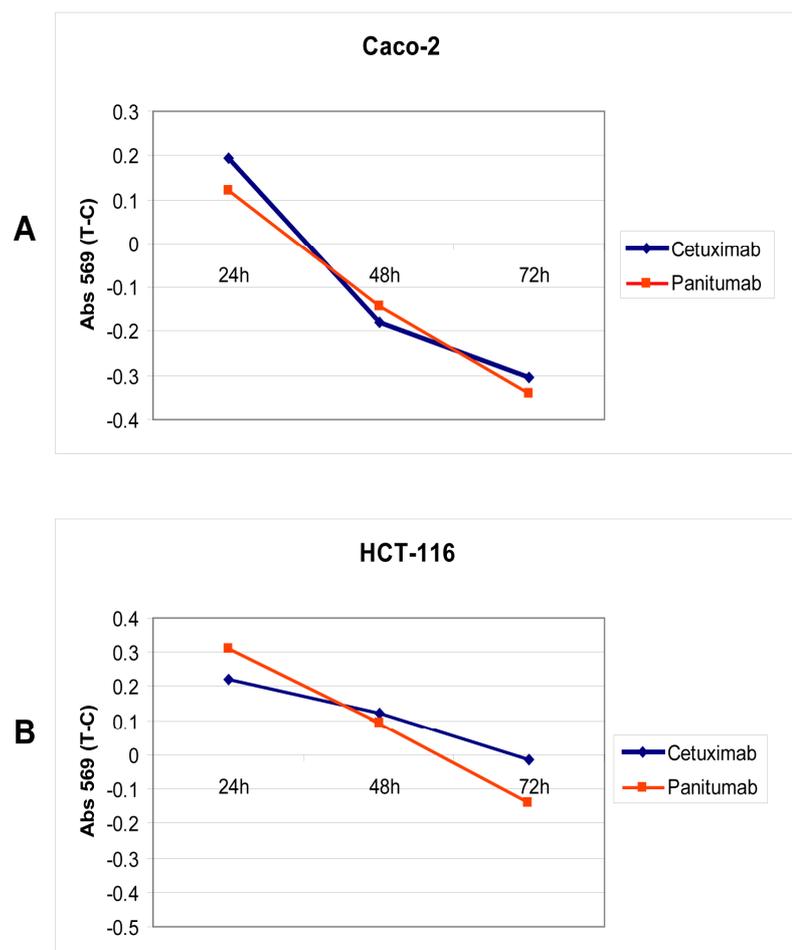


Figura 23. Saggio di vitalità cellulare su cellule di adenocarcinoma del colon dopo somministrazione di cetuximab e panitumumab. Valori di assorbanza a 569 nm nelle CaCo-2 (A) e nelle HCT-116 (B) ai tre differenti time points. T=trattato; C=controllo.

3.2 ESPRESSIONE DEI microRNA IN LINEE CELLULARI CRC DOPO TRATTAMENTO AL CETUXIMAB

Per identificare la diversa espressione dei miRNA in due linee cellulari di CRC con una differente sensibilità al Cetuximab, abbiamo analizzato il profilo d'espressione di 667 miRNA nelle CaCo-2 e nelle HCT-116, 24h e 48h dopo trattamento, usando la tecnologia *TaqMan Low Density Array* (TLDA). Per verificare la riproducibilità del sistema delle TLDA e dimostrare la robustezza

dei dati abbiamo calcolato la correlazione di Pearson (r ; $p < 0.01$) tra i ΔCt dei replicati biologici di cellule trattate e non trattate. Abbiamo quindi trovato una forte concordanza tra i tre replicati biologici di ciascun campione (valore r medio $> 0.87 \pm 0.07$) (Figura 24). I valori di r sono stati calcolati usando i ΔCt di tutti i miRNA analizzati nelle fluidic cards. Rimuovendo i valori di $Ct > 35$ da questa analisi, il valore r medio era $> 0.95 \pm 0.03$.

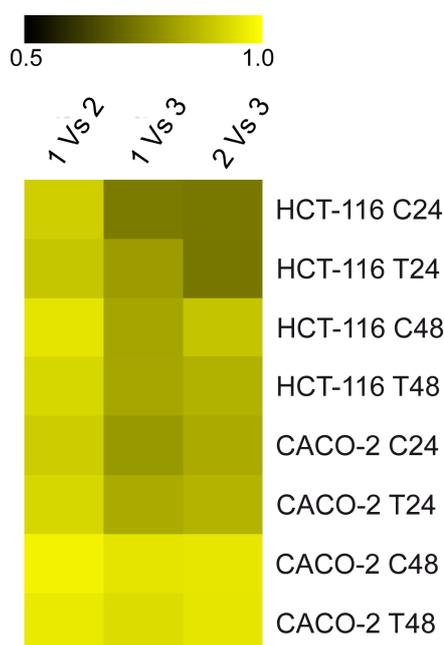


Figura 24: Valori della matrice r calcolati per ogni possibile coppia di replicati biologici (P value < 0.01 ; $N=673$). I numeri 1, 2, 3 indicano i replicati biologici

I risultati ottenuti utilizzando due differenti metodi di normalizzazione ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ e Global Median Normalization) sono comparabili, tuttavia abbiamo scelto il metodo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ per le analisi successive poiché si è mostrato essere più stringente. Nella figura 25 è mostrato il pattern di espressione di 667 miRNA nelle Caco-2 e nelle HCT-116 dopo 24h e 48h dal trattamento con Cetuximab $20 \mu\text{M}$ e dei loro rispettivi controlli.

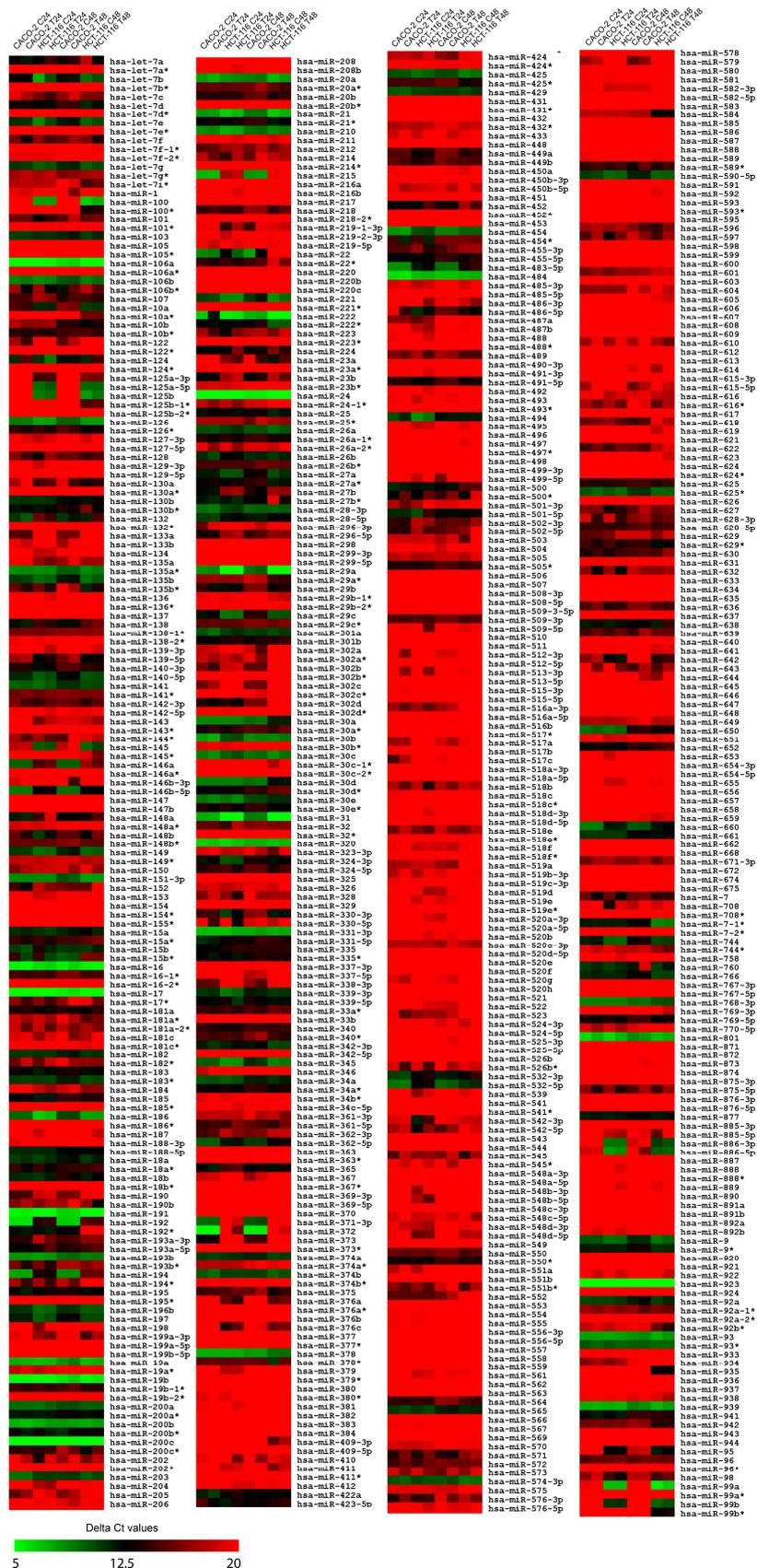


Figura 25: Trascrittoma dei miRNA in cellule CRC trattate e non trattate a 24h e 48h

24h dopo il trattamento, abbiamo trovato 12 miRNA differenzialmente espressi (DE) nelle Caco-2 (6 sottoespressi e 6 sovraespressi) e 16 miRNA differenzialmente espressi (DE) nelle HCT-116 (11 sottoespressi e 5 sovraespressi) (Tabella 7)

CACO2 CNTR Vs CACO2 TREAT 24h	LN MEDIO	HCT116 CNTR Vs HCT116 TREAT 24h	LN MEDIO
hsa-miR-122	1.95	hsa-let-7b	-1.98
hsa-miR-124	-2.66	hsa-let-7e	-1.37
hsa-miR-486-5p	3.83	hsa-miR-148a	-3.38
hsa-miR-512-3p	3.54	hsa-miR-202	-3.90
hsa-miR-523	3.12	hsa-miR-219-1-3p	-2.34
hsa-miR-545	-2.41	hsa-miR-330-3p	-1.35
hsa-miR-636	-1.06	hsa-miR-330-5p	4.89
hsa-miR-330-5p	3.66	hsa-miR-423-5p	-1.04
hsa-miR-517c	-2.19	hsa-miR-509-5p	3.37
hsa-miR-18a*	0.92	hsa-miR-542-3p	-2.05
hsa-miR-610	-1.73	hsa-miR-542-5p	-2.55
hsa-miR-622	-1.05	hsa-miR-708	-4.05
		hsa-miR-17*	3.16
		hsa-miR-181c*	4.77
		hsa-miR-193b*	2.74
		hsa-miR-610	-5.83

Tabella 7. MiRNA differenzialmente espressi dopo 24h di trattamento con il Cetuximab

Il set di DE miRNA alle 24h differisce nelle due linee, fatta eccezione per il miR-339-5p e il miR-610, che sono rispettivamente sovra e sottoespresso in entrambe le linee. Alle 48h il numero dei DE miRNA si riduce nelle Caco-2, in quanto si osservano 10 miRNA differenzialmente espressi (8 sottoespressi e 2 sovraespressi) mentre nelle HCT-116 in miRNA alterati sono 6 (5 sottoespressi e 1 sovraespresso) (Tabella 8).

CACO2 CNTR Vs CACO2 TREAT 48h	LN MEDIO	HCT116 CNTR Vs HCT116 TREAT 48h	LN MEDIO
hsa-miR-107	-0.93	hsa-miR-146a	1.15
hsa-miR-122	-1.29	hsa-miR-152	-3.11
hsa-miR-133b	-2.77	hsa-miR-223	-1.55
hsa-miR-146b-3p	4.70	hsa-miR-323-3p	-2.53
hsa-miR-219-1-3p	-3.55	hsa-miR-503	-4.76
hsa-miR-499-5p	-2.68	hsa-miR-597	-1.75
hsa-miR-576-3p	2.56		
hsa-miR-144*	-3.49		
hsa-miR-17*	-2.45		
hsa-miR-610	-3.49		

Tabella 8. MiRNA differenzialmente espressi dopo 48h di trattamento con il Cetuximab

Come precedentemente osservato alle 24h, i set dei miRNA differenzialmente espressi dopo 48h nelle Caco-2 e nelle HCT-116 non sono sovrapponibili, confermando così che le due linee cellulari rispondono in maniera differente al trattamento con Cetuximab, come già si evinceva dai dati MTT. E' interessante osservare che il miR-610 è sottoespresso in entrambe le linee ed entrambi i *time-point* (ad esclusione delle HCT-116 a 48h); il miR-219-1-3p è sottoespresso nelle Caco-2 a 24h e nelle HCT-116 a 48h; il miR-122, sovraespresso nelle Caco-2 a 24h, diminuisce la sua espressione dopo 48h; il miR-17* è sovraespresso nelle HCT-116 a 24h e sottoespresso nelle Caco-2 a 48h. L'espressione alterata o antitetica di questi miRNA a 24h e 48h nelle due linee cellulari potrebbe suggerire un loro importante ruolo nella cascata molecolare innescata dal Cetuximab. In media circa il 35% dei miRNA alterati a 24h nelle Caco-2 e nelle HCT-116 mostra lo stesso trend di espressione anche alle 48h: questo conferma che il processo di regolazione inizia già a 24h per poi continuare a 48h (anche se il livello di significatività di questi dati

risulta essere al di sotto della stringente soglia di accettabilità da noi stabilita e per questo motivo tali miRNA non sono riportati nella tabella 7 e tabella 8 (Figura 26).

Nel confronto dei valori di RQ dei miRNA allo *steady state* in entrambe le linee abbiamo trovato che circa il 7% di tutti i miRNA analizzati ha livelli di espressione differenti nelle due linee: ciò suggerisce che le corrispondenti network molecolari basali potrebbero predisporre diversamente le 2 linee alla risposta agli inibitori dell'EGFR. Inoltre circa l'8% dei DE miRNA (let-7b, miR-146a, miR-330-3p, miR-486-5p) nelle Caco-2 e HCT-116 trattate è differenzialmente espresso anche allo *steady state*.

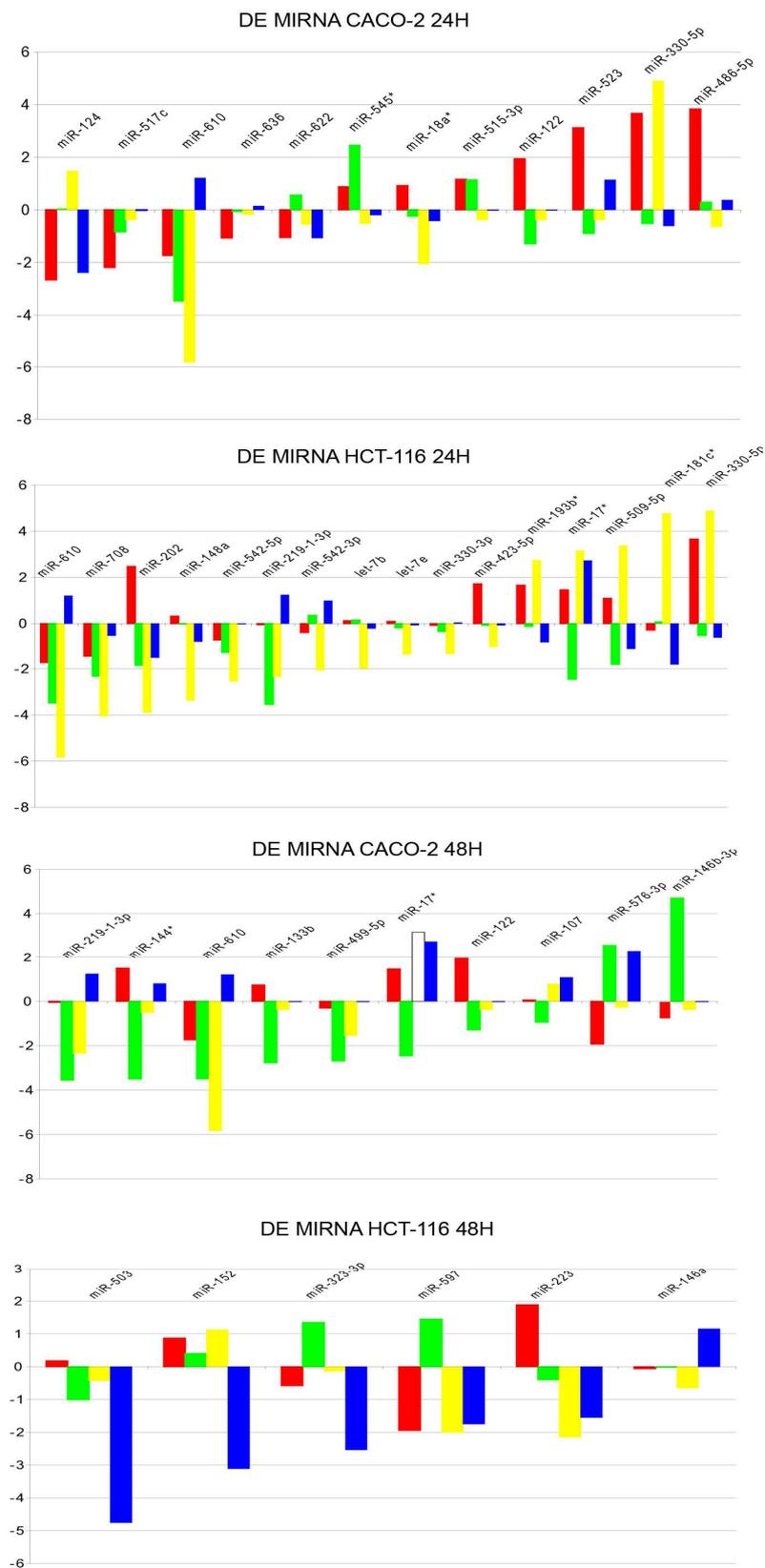


Figura 26: Andamento dei DE miRNA nelle Caco-2 e HCT-116 a 24h e 48h. Le colonne rosse rappresentano i DE miRNA nelle Caco-2 a 24h, le verdi i DE miRNA nelle Caco-2 a 48h, le gialle i DE miRNA nelle HCT-116 a 24h e le blu i DE miRNA nelle HCT-116 a 48h

3.3 CORRELAZIONE TRA MUTAZIONI DI KRAS E ESPRESSIONE DEI microRNA IN CAMPIONI CRC PARAFFINATI

In una coorte di 25 pazienti CRC, abbiamo trovato 14 pazienti con KRAS mutato e 11 con KRAS *wild-type* (Tabella 9)

Età	Mutazione KRAS	Classificazione Istopatologica
75	Gly12Asp (GGT>GAT)	Adenocarcinoma papillare mucinoso del colon destro, moderatamente differenziato (G2), metastatico
61	Gly12Asp (GGT>GAT)	Adenocarcinoma mucinoso del cieco, moderatamente differenziato (G3), metastatico
67	Gly12Val (GGT>GTT)	Adenocarcinoma mucinoso del colon sinistro, moderatamente differenziato (G2)
28	Gly12Val (GGT>GTT)	Adenocarcinoma mucinoso del colon sinistro, scarsamente differenziato (G3), metastatico
56	Gly12Val (GGT>GTT)	Adenocarcinoma del sigma-retto, moderatamente differenziato (G2)
69	Gly12Ala (GGT>GCT)	Adenocarcinoma mucinoso del sigma-retto, moderatamente differenziato (G2), metastatico
65	Gly12Val (GGT>GTT)	Adenocarcinoma rettale, moderatamente differenziato (G2)
61	Gly13Asp (GGC>GAC)	Adenocarcinoma del cieco moderatamente differenziato (G3), metastatico
42	Gly13Asp (GGC>GAC)	Adenocarcinoma del sigma-retto, moderatamente differenziato (G2)
63	Gly12Val (GGT>GTT)	Adenocarcinoma del sigma-retto, moderatamente differenziato (G2), metastatico
62	Gly12Asp (GGT>GAT)	Adenocarcinoma del colon destro, moderatamente differenziato (G2), metastatico
79	No mutazione	Adenocarcinoma del sigma, moderatamente differenziato (G2)
78	No mutazione	Adenocarcinoma del colon sinistro, scarsamente differenziato (G3), metastatico
72	No mutazione	Adenocarcinoma del cieco, moderatamente differenziato (G2), metastatico
66	No mutazione	Adenocarcinoma del colon sinistro, moderatamente differenziato (G2)

45	No mutazione	Adenocarcinoma del colon sinistro, scarsamente differenziato (G3), metastatico
82	No mutazione	Adenocarcinoma mucinoso del colon destro, moderatamente differenziato (G2), metastatico
62	No mutazione	Adenocarcinoma rettale, moderatamente differenziato (G2), metastatico
48	No mutazione	Adenocarcinoma mucinoso della valvola ileocecale, moderatamente differenziato (G2), metastatico
55	No mutazione	Adenocarcinoma dell'intestino tenue, scarsamente differenziato
65	No mutazione	Adenocarcinoma del colon destro, moderatamente differenziato (G2), metastatico
79	No mutazione	Adenocarcinoma mucinoso del colon destro, moderatamente differenziato (G2), metastatico
71	No mutazione	Adenocarcinoma mucinoso del sigma-retto, scarsamente differenziato (G3), metastatico
88	No mutazione	Adenocarcinoma del sigma, moderatamente differenziato
69	No mutazione	Adenocarcinoma dell'intestino tenue, scarsamente differenziato

Tabella 9: Caratteristiche istopatologiche e mutazioni KRAS dei campioni CRC paraffinati

Dalla lista dei DE miRNA e dei miRNA che non variano dopo trattamento nelle linee, abbiamo scelto un set di 10 miRNA da testare in questi pazienti: miR-17a, miR-19a*, miR-99b, miR-146b-3p, miR-194, miR-219-1-3p, miR-330-5p, miR-486-5p, miR-497, miR-708. I nostri dati indicano che non esistono differenze significative tra pazienti con KRAS *wild-type* e pazienti con KRAS mutato per miR-17a, miR-19a*, miR-99b, miR-194, miR-219-1-3p, miR-330-5p, miR-497, miR-708 (Wilcoxon rank sum test: $p=0.42$ per miR-17a; $p=0.27$ per miR-19*; $p=0.11$ per miR-99b; $p=0.18$ per miR-194; $p=0.34$ per miR-219-1-3p; $p=0.36$ per miR-330-5p; $p=0.5$ per miR-497; $p=0.34$ per miR-708). Al contrario, miR-146-b-3p e miR-486-5p mostrano livelli di espressione significativamente più elevati nei pazienti con KRAS mutato

(Wilcoxon rank sum test: $p < 0.03$ and $p < 0.006$, rispettivamente per miR-146b-3p e miR-486-5p) (Figura 27)

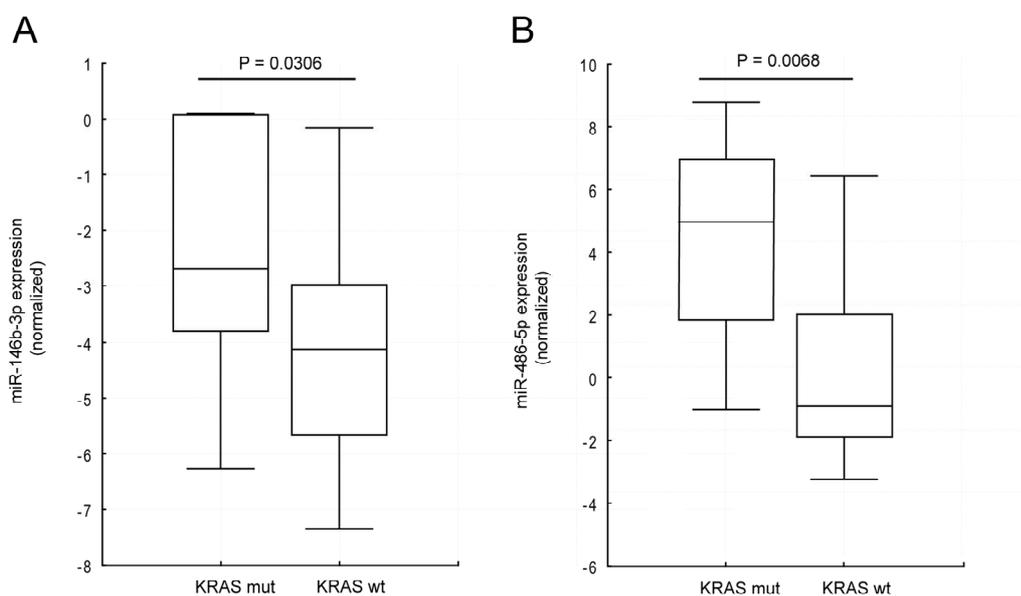


Figura 27: Sovraespressione dei miR-146b-3p e miR-486-5p in pazienti CRC con KRAS mutato. Grafico Box and Whisker Plot dell'espressione del miR-146b-3p (A) e del miR-486-5p (B) in campioni FFPE (*Formalin-Fixed Paraffin Embedded*). I valori di espressione vengono mostrati come delta Ct normalizzati con snRNA U6 e moltiplicati per -1.

Entrambi questi miRNA sono sovraespressi nelle Caco-2 dopo trattamento con il Cetuximab. Inoltre il miR-486-5p è più espresso nelle HCT-116 (con KRAS mutato) rispetto alle Caco-2 (con KRAS *wild-type*), rispecchiando nelle linee ciò che avviene nei pazienti.

3.4 REGOLAZIONE DELLE FAMIGLIE DI microRNA E DEI CLUSTERS GENOMICI

Per valutare l'eventuale regolazione di *clusters* dei miRNA, abbiamo analizzato l'espressione di miRNA localizzati in prossimità nel genoma (separati da $< 5\text{Kb}$). Abbiamo trovato che miRNA localizzati nella stessa regione genomica presentano lo stesso *trend* di espressione nel confronto tra le

due linee allo *steady state*; miRNA localizzati vicino a DE miRNA hanno *trend* di espressione simile, anche se, a causa dell'alto livello di stringenza da noi scelto, non sono inclusi nella classe dei DE (quindi ad esempio hanno valori medi di LN minori di 1 o maggiori di -1). Ad esempio, il cluster miR-194/miR-215 sul cromosoma 1 e il cluster miR-372/miR-373 sul cromosoma 19 sono espressi ad alti livelli nelle Caco-2 rispetto alle HCT-116; al contrario, il cluster contenente miR-18b, miR-19b-2, miR-20b, miR-92-2, miR-106a, miR-363 sul cromosoma X è espresso a livelli più bassi nelle Caco-2 rispetto alle HCT-116 (Figura 28)

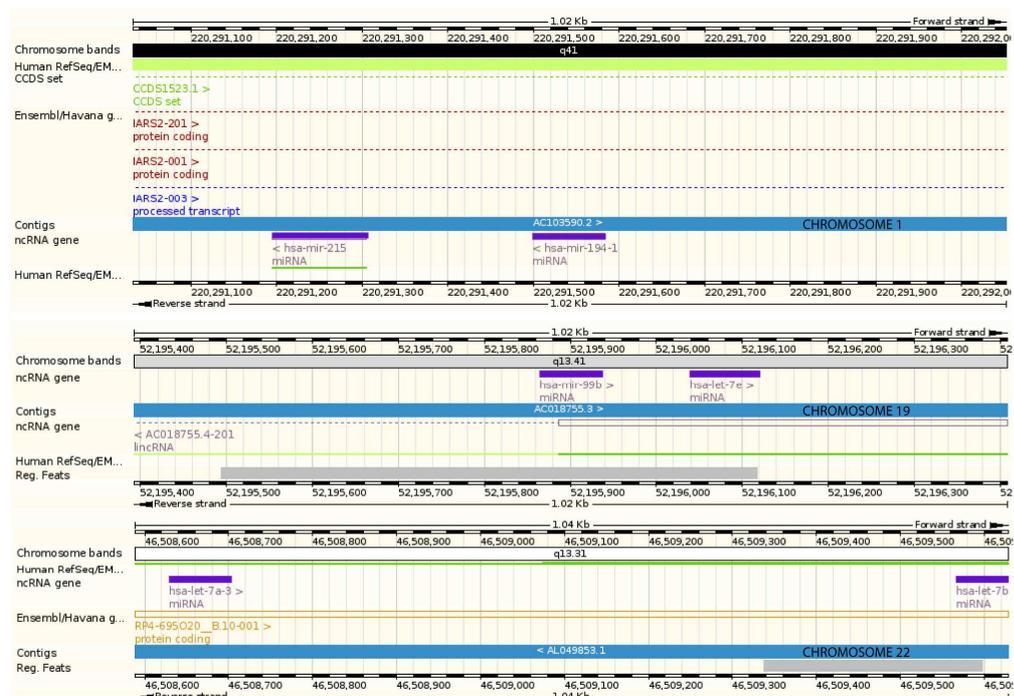


Figura 28: cluster di DE miRNA co-regolati dopo trattamento nelle Caco-2 (miR-194/miR-215) o nelle HCT-116 (miR-99b/let-7e e let-7a/let-7b).

Nella maggior parte dei casi, miRNA in stretta prossimità genomica (cioè che distano tra loro meno di 1 Kb) mantengono lo stesso *trend* di espressione anche dopo somministrazione del Cetuximab, come ad esempio i *clusters* miR-

99b/let-7e e let-7a/let-7b che sono sottoespressi nelle HCT-116 trattate (Figura 28). Ciò potrebbe essere dovuto alla presenza di domini di attivazione della cromatina o di regioni promotrici comuni. Al contrario, l'espressione dei miRNA appartenenti a *clusters* più grandi (cioè da 1 Kb a 5 Kb) avviene in maniera differente e non coordinata durante il trattamento. Abbiamo quindi effettuato la stessa analisi per i miRNA omologhi appartenenti a famiglie e localizzati in loci differenti. Abbiamo così identificato 22 famiglie comprendenti 39 miRNA, i cui *pattern* di espressione risultano differenti tra le linee sia allo *steady-state* che dopo trattamento. Tuttavia le famiglie dei miR-99, miR-192 e miR-290 mostrano espressione simile allo *steady-state*. E' interessante notare che let-7b e let-7e, appartenenti alla famiglia di let-7, e miR-148a e miR-152, appartenenti alla famiglia del miR-148, sono tutti sottoespressi nelle HCT-116 dopo 24h di trattamento: ciò potrebbe essere dovuto a segnali regolatori comuni e alla stessa origine evolutiva.

3.5 IDENTIFICAZIONE DI TFBS PER microRNA COREGOLATI

Al fine di trovare un meccanismo di regolazione comune deputato al controllo dell'espressione dei miRNA dopo il trattamento abbiamo ricercato la presenza di TFBS (*Transcription Factor Binding Site*) conservati nelle regioni genomiche a monte dei geni per i miRNA e valutato la correlazione nell'espressione tra TF e miRNAs. Abbiamo trovato TFBSs per 203 fattori di trascrizione, tra i quali 25 sono stati selezionati per alto numero di occorrenze, per il loro coinvolgimento nel tumore al colon e nella risposta farmacologica secondo dati di letteratura (Tabella 10).

TRANSCRIPT ION FACTOR OFFICIAL GENE SYMBOL	NUMBER OF MIRNA CONTROLLED	MIRNA	CRC- RELATED PUBMED ID	EGFR PATHWAY- RELATED KEGG ID
CUX1	5	152,148a, 219-1-3p, 107, 423-5p		
ELK1	2	523, 193b*		ko04012
FOXA2	5	122,107, 124, 152, 323-3p	17283222	
FOXD3	11	146a, 146b-3p, 122, 124,330-3p, 330-5p, 17*, 517c, 152,let-7e		
FOXJ2	4	133b, 146b-3p, 148°, let-7e		
GATA1	6	144*,523, 124, 133b, 152, 181c*		
HAND1	5	499-5p, 107, 219-1-3p, let- 7b, 181c*	19723660	
HNF1A	7	133b, 107, 122, 423-5p, 17*, 503, 146b-3p		
HNF4A	19	144*, 18a*, 202, 517c, 107, 181c*, 330-3p, 330-5p, 323- 3p, 17*, 499-5p, let-7e, 124, 148a, 503, 146b-3p, 193b*, 219-1-3p, let-7b		
JUN	6	let-7e, let-7b, 219-1-3p, 323-3p, 181c*, 148°	20395206	
MAF	8	499-5p, 146b-3p,330-3p, 330-5p, 122, 124, 219-1-3p, let-7b		
MYB	6	523, 148a, 124, 17*, 202, 193b*	18574464	
MYC	4	17*, let-7e, 499-5p, let-7b	20029424	ko04012
MYOG	4	133b, 17*, 499-5p, 219-1-3p		
NKX2-5	6	193b*, 133b, 499-5p, 17*,423-5p, 219-1-3p		
PAX4	9	499-5p, 133b, 330-3p, 330- 5p, 323-3p, 17*, 152, 219-1- 3p, 122		
PAX6	7	503, 323-3p, 148a, 133b, 146a, 219-1-3p, 146b-3p	10344734	
POU2F1	12	144*, 18°, 517c, 523, 133b, 17*, 330-3p, 330-5p, 148a, 152, 193b*, 219-1-3p		
PPARG	2	107, 144*	18391483	
REL	3	133b, 17*, 193b*		
RUNX1	13	107, 18a*, 523, 223, 122, 181c*, 124, 17*, 499-5p, 133b, 202, 193b*, 219-1-3p		

TCF3	18	486-5p, 144*, 523, 107, let-7b, 124, 330-3p, 330-5p, 17*, 181c*, 193b*, 202, 499-5p, 512-3p, 517c, 146b-3p, 323-3p, 219-1-3p	11326276	
TP53	3	202, 107, 223	16172461	
YY1	3	107, let-7e, 181c*	19360355	
ZEB1	2	517c, 423-5p	17486063	

Tabella 10: Lista di fattori di trascrizione predetti o validati più rappresentativi e miRNA da

essi controllati.

Abbiamo quindi filtrato e validato questi dati attraverso analisi della correlazione di espressione tra TFs e miRNA: questo ci ha permesso di identificare HNF4A, RUNX1, TCF3 come i TFs che controllano il più alto numero di DE miR (≥ 15) in entrambe le linee dopo trattamento. Abbiamo inoltre trovato che alcuni TF che svolgono un ruolo nello sviluppo degli organi o che sono coinvolti in altri tipi di tumore, hanno un alto numero di TFBS e sono correlati all'espressione dei miRNA (ad esempio FOXD3, GATA1, HNF1A, MAF, NKX2-5, PAX4 e POU2F1). Basandoci su questi dati, noi ipotizziamo il loro potenziale coinvolgimento anche nella risposta al Cetuximab nel tumore al colon-retto. Come atteso, molti DE miRNA sono controllati da fattori di trascrizione per i quali era stato dimostrato precedentemente il coinvolgimento nel tumore coloretale: MYC, amplificato e sovraespresso in CRC e altri tumori; TCF3, controllato dalla *pathway* di WNT; YY1 e ZEB1 sovraespressi in CRC; HAND1 e PAX6, frequentemente ipermetilati in CRC; JUN, attivato dalla cascata di KRAS; MYB, attivato in CRC; TP53, deletato o mutato in CRC (Tabella 10).

Interessantemente abbiamo trovato che alcuni geni controllati da KRAS e coinvolti nella *pathway* del Cetuximab controllano potenzialmente alcuni DE miRNA. Ad esempio, abbiamo predetto che ELK1 regoli miR-193b* e miR-523, con i quali è correlato positivamente; STAT1, attivato dall'*EGF signalling*, potrebbe essere responsabile della maggior abbondanza del miR-146b-3p nelle biopsie con KRAS mutato.

Inoltre, nella linea con KRAS wild-type, il miR-145, che controlla STAT1 nel cancro al colon (70) è sottoespresso. Ciò potrebbe quindi determinare la sovraregolazione di STAT1 e quindi del miR-146b-3p, osservata in questa linea dopo trattamento farmacologico.

Tramite il database TransMir, contenente solo interazioni TF/miRNA validate, abbiamo trovato che MYC reprime let-7b e let-7e (i cui pre-miR hanno anche espressione anti-correlata con MYC) e quindi potrebbe essere responsabile della sottoespressione di questi due miRNA alle 24h. Infine, l'espressione del miR-17* in entrambe le linee dopo trattamento potrebbe essere dovuta al controllo del *cluster* miR-17-92 da parte di MYC e dei geni NKX2-5, TLX1 e TLX3 (della famiglia *NK-like family of homeobox genes*).

3.6 ANALISI DEI TARGETS

Al fine di valutare la rilevanza biologica dei 38 miRNA differenzialmente espressi dopo trattamento, abbiamo ricercato in letteratura dati sulla loro eventuale disregolazione nelle malattie umane, ed abbiamo osservato che il 67% dei miRNA disregolati sono coinvolti nel cancro, di cui il 20% in particolare è correlato al cancro al colon-retto. Inoltre il 50% dei miRNA differenzialmente espressi tra le due linee allo steady state è coinvolto in CRC.

Mediante analisi computazionale abbiamo identificato 513 *targets* dei DE miRNA (226 validati sperimentalmente e 287 predetti). Tutti i *targets* predetti, selezionati per le analisi successive, hanno coefficiente di Pearson negativo nell'analisi di correlazione con i miRNA ($p < 0.05$). Abbiamo trovato che il 10% di questi *targets* è rappresentato da proteine coinvolte nel cancro e tra queste il 30% è specificamente coinvolta in CRC. Inoltre, è riportato in letteratura che circa il 36% dei *targets* da noi individuati è coinvolto nella risposta alla chemioterapia in nel tumore al colon-retto e 11 *targets* in particolare sono coinvolti nella risposta al Cetuximab (Tabella 11).

	Geni target	DE miRNAs predetti o validati	Caco-2 expression	HCT-116 expression
Targets precedentemente riportati in letteratura come coinvolti nella pathway del Cetuximab	C18orf37	hsa-miR-124	Down, 24 h PT	
	CCND1	hsa-let-7b		Down, 24 h PT
	FAM57A	hsa-miR-124	Down, 24 h PT	
	MAP2K4	hsa-miR-576-3p	Up, 48 h PT	
	MRAS	hsa-miR-330-5p	Up, 24 h PT	Up, 24 h PT
	NRAS	hsa-let-7b		Down, 24 h PT
	PIK3R1	hsa-mir-486-5p	Up, 24 h PT	
	PRKCA	hsa-miR-330-5p	Up, 24 h PT	Up, 24 h PT
	SP1	hsa-miR-124	Down, 24 h PT	
	STAT5A	hsa-miR-509-5p		Up, 24 h PT
	VEGFA	hsa-miR-330-3p		Down, 24 h PT
	VEGFA	hsa-miR-330-5p	Up, 24 h PT	Up, 24 h PT
Targets precedentemente riportati in letteratura come coinvolti in CRC	ABCA1	hsa-miR-152		Down, 48 h PT
	BCL9	hsa-miR-330-3p		Down, 24 h PT
	EYA4	hsa-miR-124	Down, 24 h PT	
	PRKCB1	hsa-miR-330-3p		Down, 24 h PT
	PRKD1	hsa-miR-124	Down, 24 h PT	
	PTEN	hsa-mir-486-5p	Up, 24 h PT	
	PTPN12	hsa-mir-486-5p	Up, 24 h PT	
	PTPN12	hsa-miR-124	Down, 24 h PT	
	TRIM33	hsa-miR-512-3p	Up, 24 h PT	
	CCND1	hsa-let-7b		Down, 24 h PT
	MAP2K4	hsa-miR-576-3p	Up, 48 h PT	
	NRAS	hsa-let-7b		Down, 24 h PT
	PIK3R1	hsa-mir-486-5p	Up, 24 h PT	
	PRKCA	hsa-miR-330-5p	Up, 24 h PT	Up, 24 h PT

Targets precedentemente riportati in letteratura come coinvolti in CRC e nella risposta farmacologica	CASP3	hsa-let-7b		Down, 24 h PT
	CCND1	hsa-let-7b		Down, 24 h PT
	RELA	hsa-miR-124	Down, 24 h PT	
	VEGFA	hsa-miR-330-3p		Down, 24 h PT
	VEGFA	hsa-miR-330-5p	Up, 24 h PT	Up, 24 h PT
	GADD45A	hsa-miR-152		Down, 48 h PT
	CYP1B1	hsa-miR-124	Down, 24 h PT	
	AHR	hsa-miR-124	Down, 24 h PT	
	IL1A	hsa-miR-146b-3p	Up, 48 h PT	
	CYP19A1	hsa-let-7b, hsa-let-7e		Down, 24 h PT
	ESR1	hsa-miR-330-3p		Down, 24 h PT
	ESR1	hsa-miR-152		Down, 48 h PT
	SLC16A1	hsa-miR-124	Down, 24 h PT	
	SP1	hsa-miR-124	Down, 24 h PT	
	CDK4	hsa-miR-124	Down, 24 h PT	
	MAPK14	hsa-miR-124	Down, 24 h PT	
	PRKCA	hsa-miR-330-5p	Up, 24 h PT	Up, 24 h PT
	ABCC5	hsa-let-7e		Down, 24 h PT
	CTGF	hsa-miR-124	Down, 24 h PT	
	PTEN	hsa-mir-486-5p	Up, 24 h PT	
	TOB1	hsa-mir-486-5p	Up, 24 h PT	
	CAV1	hsa-miR-124	Down, 24 h PT	
	CXCR4	hsa-miR-146a		Up, 48 h PT
	ITGB1	hsa-miR-124	Down, 24 h PT	
	NR1I2	hsa-miR-148a		Down, 24 h PT
	RUNX2	hsa-miR-636	Down, 24 h PT	
	ALDOA	hsa-miR-122	Up, 24 h PT - Down, 48 h PT	
	CDK6	hsa-let-7b		Down, 24 h PT
	CDK6	hsa-miR-124	Down, 24 h PT	
	CEBPA	hsa-miR-124	Down, 24 h PT	
	COL6A3	hsa-miR-330-3p		Down, 24 h PT
	ID2	hsa-miR-330-3p		Down, 24 h PT
LMNB1	hsa-miR-124	Down, 24 h PT		
NGFR	hsa-miR-330-5p	Up, 24 h PT	Up, 24 h PT	
SLC2A1	hsa-miR-152		Down, 48 h PT	

Tabella 11: Lista dei DE microRNA predetti o validati e relativi targets coinvolti in CRC, Cetuximab e chemioterapia.

3.7 NETWORK E GENE ONTOLOGIES DEI TARGETS

Per tutti i miRNA differenzialmente espressi dopo trattamento per linea e per *time-point* abbiamo ottenuto le informazioni sulle interazioni proteina-proteina e DNA-proteina dei *targets* validati, *targets* predetti anticorrelati e dei loro primi interattori. Con questi dati abbiamo costruito 4 *network* (Figura 29):

- la *network* delle Caco-2 a 24h (2594 nodi)
- la *network* delle Caco-2 a 48h (712 nodi)
- la *network* delle HCT-116 a 24h (2244 nodi)
- la *network* delle HCT-116 a 48h (839 nodi)

Interessantemente abbiamo trovato che le proteine AKT1, GRB2, MYC, NFKB2, PLCG1, RAF1, SP1, tutte correlate alla *pathway* del Cetuximab, sono nodi comuni a tutte e quattro le *network* e nella maggior parte dei casi rappresentano *hubs* (> 90 interattori).

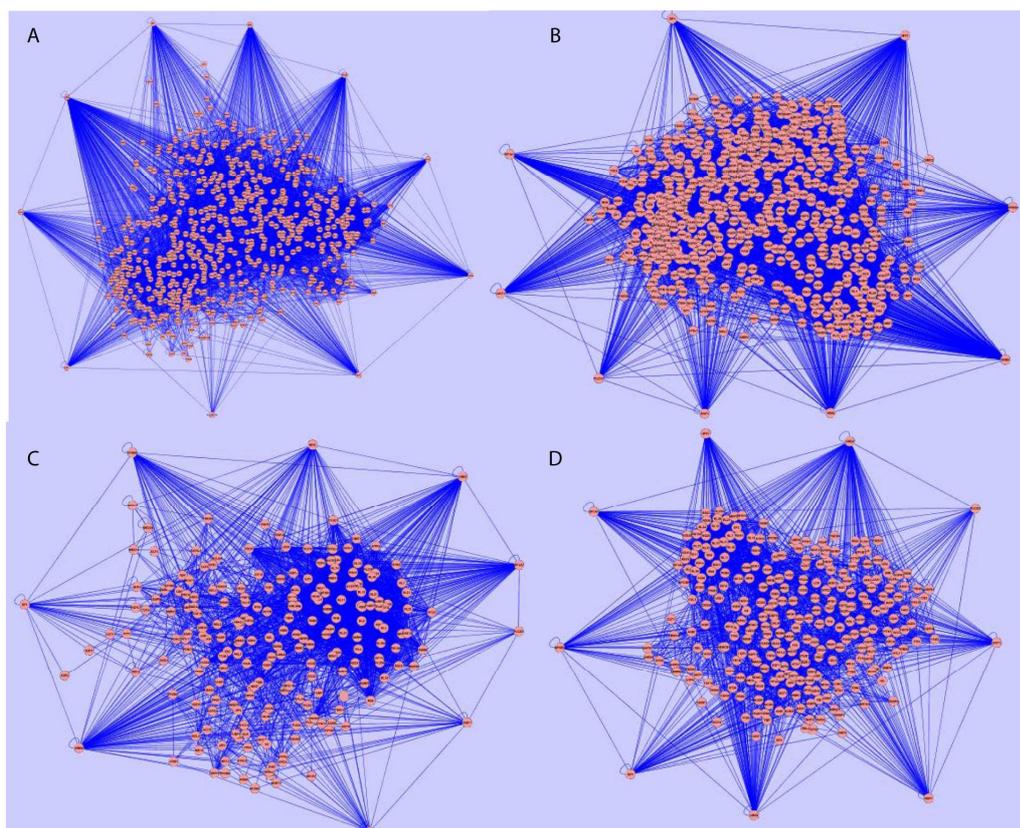


Figura 29: Network dei target validati e predetti anticorrelati dei DE miRNA nelle Caco-2 a 24h (A), HCT-116 a 24h (B), Caco-2 a 48h (C) e HCT-116 a 48h (D). I nodi più esterni di ciascuna network rappresentano gli hub AKT1, GRB2, MYC, NFkB2, PLCG1, RAF1, SP1, EEF1A1 e UBC.

Inoltre il 6.7%, 6.7%, 7.2%, 8.7% dei geni rispettivamente delle Caco-2 a 24h, Caco-2 a 48h, HCT-116 a 24h, HCT-116 a 48h PT è coinvolta in tumori, incluso il CRC; il 23.2%, 20.8%, 23.5%, 26.5% di questi geni è coinvolta alla risposta farmacologica nel tumore al colon-retto. Dopo aver effettuato l'analisi della centralità nelle network abbiamo trovato che EEF1A1, GRB2 e UBC (quest'ultimo interattore dei targets dei DE miRNA) sono le proteine che presentano il più alto *degree*. In particolare, GRB2 ha 332 interattori nella network delle Caco-2 a 24h, 97 in quella a 48h, 254 interattori nella network delle HCT-116 a 24h e 123 in quella a 48h. Per questa proteina è già stato riportato in letteratura il coinvolgimento nella risposta farmacologica del

tumore al colon-retto al Cetuximab e, più in generale, alla chemioterapia (103). Anche EEF1A1, considerato un regolatore della crescita cellulare e del citoscheletro, ha mostrato sovraespressione nei tumori (incluso il CRC) e secondo dati di letteratura è coinvolto nella risposta farmacologica in CRC (21; 104-105). UBC è un componente chiave nel sistema di degradazione ubiquitina-mediato nel proteosoma, che gioca un ruolo importante nella regolazione della proliferazione delle cellule epiteliali colo-rettali ed è quindi implicato nella carcinogenesi in questo tessuto (106).

Tramite analisi statistiche abbiamo determinato le *Gene Ontologies* (GO) significativamente sovra-rappresentate in ciascuna delle 4 *network*, e successivamente focalizzandoci sul confronto tra le due linee per ciascun *time-point*.

GO terms sovra-rappresentati comuni alle due linee

L'analisi per il punto a 24h ha evidenziato un alto numero di occorrenze nelle due linee per i processi comuni quali regolazione della trascrizione, regolazione della proliferazione cellulare, motilità cellulare, angiogenesi, regolazione dell'attività delle MAPK, apoptosi; per contro, la stessa analisi del punto a 48h ha evidenziato come GO comuni alle due linee solo quelle generali della trascrizione, regolazione della proliferazione e apoptosi (Hypergeometric test, Benjamini adjusted $p \leq 0.00005$) (Figura 30).

GO terms sovra-rappresentati in una sola linea

Interessantemente abbiamo osservato che le proteine della *network* delle Caco-2 a 24h è arricchita in *GO terms* relativi a processi quali apoptosi,

differenziamento e regolazione negativa della crescita cellulare e migrazione, regolazione dell'attività delle MAPK, delle *pathways* di WNT e NOTCH e dell'attività di VEGF rispetto alle HCT-116, che invece hanno *GO terms* sovrarappresentati solo per i processi relativi all'angiogenesi. Dopo 48h la network delle HCT-116 è arricchita in proteine aventi *GO terms* relativi a differenziamento, regolazione positiva della crescita cellulare e della migrazione, transizione mesenchima-epitelio, regolazione della cascata delle MAPK, angiogenesi e *pathways* dell'EGFR e VEGF (Hypergeometric test, Benjamini FDR adjusted $p < 0.05$) (Figura 30).

Nella nostra analisi delle GOs anche i processi correlati all'immunità sono rappresentati in maniera estensiva: rispetto alle HCT-116 le Caco-2 sono arricchite in proteine coinvolte nell'attivazione dei mediatori molecolari dell'infiammazione sia a 24h che a 48h (Figura 30). Inoltre nelle Caco-2, sia a 24h che a 48h, abbiamo trovato diverse GOs relative all'attività di NF-kappaB, che sono assenti nelle HCT-116 (Figura 30).

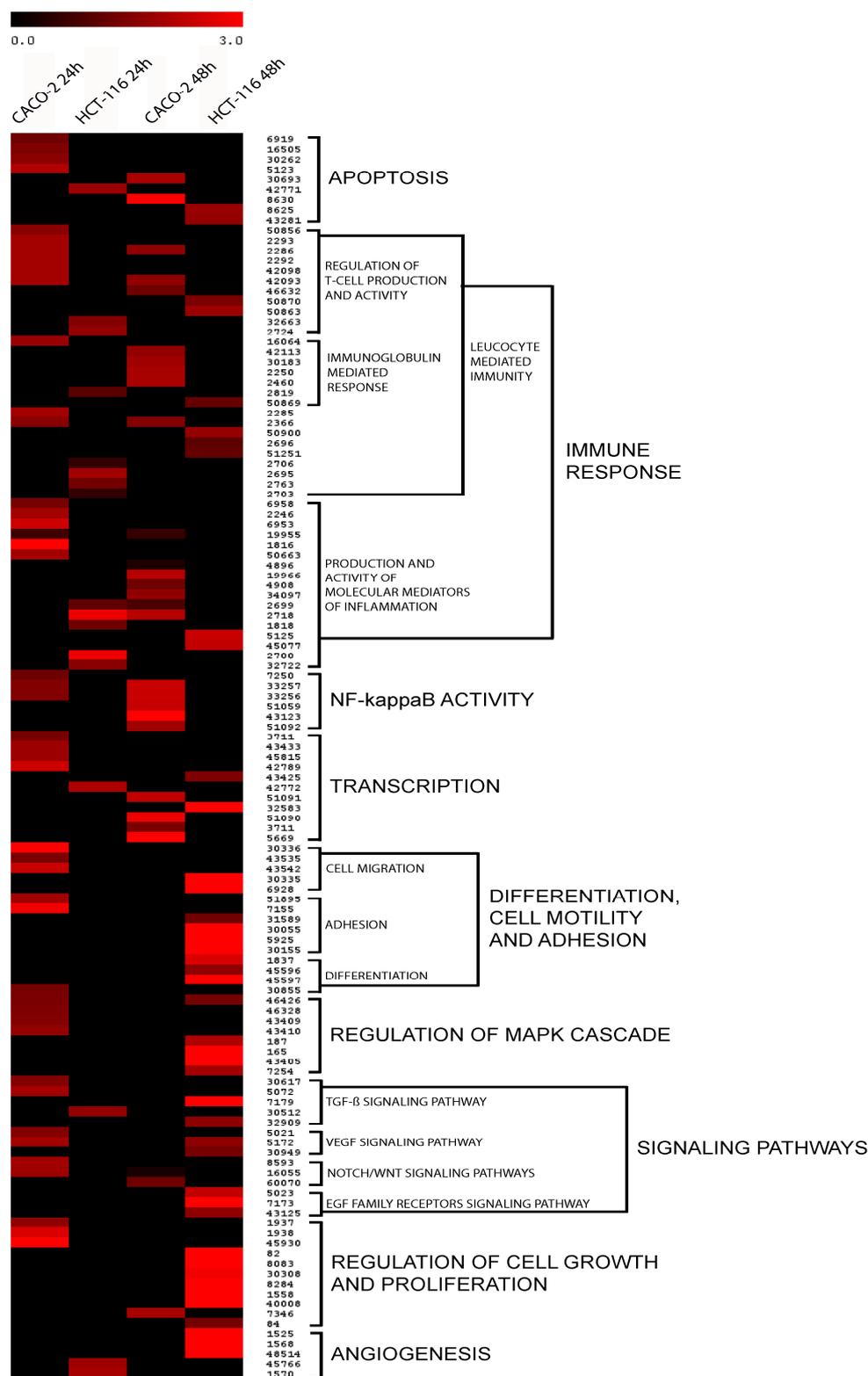


Figura 30 Matrice delle *Gene Ontology* delle *network* basate sui target dei DE miRNA. Righe, GO ID; colonne, campioni. La scala di valori rappresentata in alto rappresenta il $-\log$ del p-value calcolato dopo test ipergeometrico. In nero le GO assenti nella *network*, in scala di rosso le GO presenti.

Tramite confronto tra le *network* a 24h e a 48h abbiamo infine identificato le differenze statisticamente significative tra le GOs. Da quest'analisi è emerso che nelle Caco-2 a 24h rispetto a 48h è maggiore il numero di processi biologici e funzioni molecolari relative alla trasduzione del segnale, attività di recettore trans-membrana, cascate di segnalazione innescate da recettori associati a proteine G (Fisher's exact test, adjusted $p < 0.05$).

4. DISCUSSIONE

Le basi molecolari della risposta alle terapie contro il cancro sono complesse, poiché comportano processi multipli e corrispondenti *pathways* e *network* cellulari (107, 108). La nuova generazione di terapie mirate è stata concepita per incidere su specifici processi molecolari che controllano la crescita tumorale, la sopravvivenza, l'apoptosi (109). Sono stati sviluppati diversi agenti antitumorali che interferiscono con la *pathway* dell'*Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) (109). Tra questi, il Cetuximab è utilizzato per il trattamento CRC sia come monoterapia sia in combinazione con altri chemioterapici (110). I meccanismi attraverso i quali il Cetuximab svolge la sua attività antitumorale sono numerosi e non ancora del tutto compresi: essi includono l'inibizione della progressione del ciclo cellulare, dell'angiogenesi, dell'invasione e della metastatizzazione, l'attivazione dell'apoptosi, e la citotossicità sinergica con la chemioterapia e radioterapia (111). Il *genome-wide profiling* dell'espressione degli mRNA è stato utilizzato per comprendere i circuiti di regolazione innescati da farmaci. Inoltre è stato notato che i livelli di mRNA e delle proteine codificate spesso non sono sovrapponibili: tra le cause possibili vi è la regolazione genica post-trascrizionale mediata dai miRNA (13). I miRNA potrebbero avere un ruolo critico nel controllo di segnali complessi attivati sia da stimoli interni che esterni, come quelli innescati dai farmaci antitumorali (112). L'espressione dei miRNA infatti è

fortemente implicata nella tumorigenesi e nella progressione del carcinoma al colon-retto (71,77, 113): di conseguenza, abbiamo ipotizzato che i microRNA possano influire in maniera incisiva sulla risposta al Cetuximab. Infatti, i dati di espressione riportati in questa tesi mostrano che il trattamento con Cetuximab induce cambiamenti nel trascrittoma dei miRNA in linee cellulari farmaco-sensibili e farmaco-resistenti. Queste variazioni di espressione riguardano sia singoli miRNA che miRNA appartenenti a *cluster* o famiglie (ad esempio, le famiglie di let-7 e miR-148). È interessante notare che l'insieme dei miRNA differenzialmente espressi (DE) nelle due linee cellulari è quasi interamente non sovrapponibile, con esclusione del miR-219-1-3p, miR-330-5p, miR-610, alterati in maniera identica in entrambe le linee. Questi tre miRNA, se validati su un numero più alto di linee e su pazienti, potrebbero rappresentare marcatori di risposta al Cetuximab, la cui espressione è indipendente dallo stato di KRAS. I dati sui DE miRNA indicherebbero una diversa organizzazione del trascrittoma nei due sistemi modello, dovuti probabilmente agli individuali assetti genomici delle due linee. Queste differenze potrebbero quindi influenzare le relative *network* molecolari e innescare risposte diverse agli inibitori dell'EGFR: per esempio, l'attivazione costitutiva di KRAS nelle HCT-116 potrebbe portare a un diverso segnale di regolazione dei miRNA rispetto alle cellule con KRAS wild-type. Non sorprende che let-7b e let-7e siano sottoespressi nelle HCT-116 dopo il trattamento con Cetuximab: i membri della famiglia let-7 sono infatti noti perché hanno come target KRAS e, recentemente, è stato riportato il loro coinvolgimento nella risposta Cetuximab (114). Dopo il trattamento con Cetuximab, nelle linee cellulari resistenti

rimane attiva la segnalazione a valle del gene KRAS: la sottoespressione dei suoi regolatori negativi (let-7b e let-7e appunto), potrebbe essere un meccanismo che viene selezionato positivamente in queste cellule per contribuire alla resistenza al Cetuximab. I diversi trascrittomi nelle due linee cellulari potrebbero essere il risultato del controllo da parte di fattori di trascrizione (TF) coinvolti nella risposta al Cetuximab o delle *pathways* correlate. Sulla base dei nostri dati, abbiamo trovato 25 TF che putativamente controllano i miRNA in entrambi i modelli cellulari (ad esempio, HNF4A, RUNX1, TCF3), per 17 dei quali era stato precedentemente segnalato il coinvolgimento in CRC (es. MYC, TCF3) (15, 115). Alcuni di questi TF potrebbero specificamente controllare l'espressione dei DE miRNA, determinando la variazione del trascrittoma dopo il trattamento con Cetuximab (116). Abbiamo inoltre identificato un insieme affidabile di mRNA target dei DE miRNA: questi possono permetterci di approfondire i meccanismi molecolari e le *pathways* biologiche responsabili della sensibilità o della resistenza alla terapia. Curiosamente, tutti questi miRNA hanno *trend* di espressione opposto rispetto ai loro relativi mRNA *target* (Coefficiente di Pearson negativo): ciò suggerisce che queste coppie miRNA/mRNA potrebbero corrispondere a circuiti di regolazione biologicamente rilevanti nei nostri modelli (117): infatti, gli mRNA individuati in questo studio sono controllati da diversi DE miRNA già precedentemente associati al CRC (cioè, let-7, miR-17*, miR-18a, miR-107, miR-133b, miR-223) e alcuni di essi sono noti anche per essere coinvolti nella risposta al Cetuximab (let-7b, let-7e). E' da notare che il miR-17* (precedentemente noto come miR-17-3p), un marcatore

risultato abbondante nelle biopsie e nel plasma dei pazienti CRC e regolato positivamente da Myc, è sovraespresso nella linea cellulare resistente e sottoespresso in quella sensibile dopo il trattamento con Cetuximab. Questa modulazione antitetica del miR-17* potrebbe rappresentare uno dei meccanismi molecolari discriminanti della resistenza o della sensibilità. I livelli più elevati del miR-146b-3p e miR-486-5p e in campioni con KRAS mutato, rispetto a quelli di tipo *wild-type*, potrebbe essere il risultato indiretto dell'attivazione costituzionale del *signalling* di KRAS. Quasi l'80% dei *targets* del miR-486-5p sono regolatori negativi della proliferazione cellulare o sono coinvolti nell'apoptosi. Ad esempio, ARHGAP5 regola negativamente le RHO GTPasi, DOCK3 è un inibitore della via di Wnt/beta-catenina, TOB1 è una proteina anti-proliferativa che controlla la crescita cellulare, ST5 è un regolatore negativo della chinasi MAPK1/ERK2 (118-121). Inoltre, tra i *targets* del miR-486-5p c'è PIK3R1 che è noto per essere sovraespresso nei pazienti responsivi dopo il trattamento con Cetuximab (122). E' stato visto che il miR-146b-3p è un marcatore prognostico sfavorevole per i pazienti con tumore polmonare a cellule squamose o carcinoma papillare della tiroide (*Papillary Thyroid Carcinoma*, PTC) (123-125). È interessante notare che in PTC la sua sovraespressione è statisticamente associata alle mutazioni su BRAF. BRAF è un effettore a valle del gene KRAS: le sue mutazioni sono riportate in pazienti CRC e sono mutualmente esclusive rispetto a quelle di KRAS (125). Inoltre, alcune prove indirette ottenute nel cancro alla mammella suggeriscono che EGFR sarebbe il target del miR-146a e del miR-146b (126). Visti insieme questi dati suggeriscono che la maggiore abbondanza dei miR-

146b-3p e miR-486-5p nei pazienti CRC con KRAS mutato sarebbe un effetto molecolare a valle determinato dagli stimoli iperproliferativi innescati dalla mutazione nel gene KRAS o da altri nodi della stessa via. Di conseguenza, il *profiling* di questi miRNA in pazienti CRC potrebbe completare e approfondire la diagnosi basata su KRAS per prevedere la sensibilità al Cetuximab. Non sorprende che le quattro *network* dei *targets* dei DE miRNA e dei loro primi interattori siano centrate sugli stessi *hubs*: EEF1A1, GRB2, UBC. Anche se il ruolo di EEF1A1 in CRC rimane ancora poco caratterizzato, è stato dimostrato il coinvolgimento di GRB2 e UBC nella regolazione della *pathway* di EGFR (127,128). In particolare, GRB2 è una proteina-collegamento essenziale tra i recettori di superficie dell'EGF e la via di segnalazione di RAS, che partecipa alla internalizzazione di EGFR e la sua successiva ubiquitinilazione (128). Inoltre, il complesso dell'ubiquitina regola anche altre molecole chiave nella carcinogenesi in CRC e componenti della via di KRAS. Ciò significa che i circuiti di regolazione innescati dai DE miRNA si focalizzano su molecole chiave che giocano un ruolo centrale nella corretta trasmissione dei segnali da parte di EGFR, nella sua internalizzazione e nel *turn-over*. Questi risultati sono ben inseriti nello scenario degli effetti molecolari innescati dal Cetuximab: infatti è stato dimostrato che il cetuximab induce anche l'internalizzazione dell'EGFR e la sua degradazione ubiquitina-mediata. Al fine di determinare le principali funzioni biologiche e molecolari alterate dai DE miRNA, abbiamo analizzato statisticamente i GO *terms* sovra-rappresentati all'interno delle *network*: abbiamo osservato che i geni target dei DE miRNA in Caco-2, sia a 24h che a 48h sono preferibilmente coinvolti nella regolazione delle *pathways*

di Notch e Wnt, mentre il set dei DE miRNA nelle HCT-116 controllerebbe le vie di segnalazione dell'EGFR alle 48h. La *pathway* canonica di Wnt inibisce la degradazione del complesso della β -catenina nelle cripte intestinali (129). Nella nostra analisi delle GO i processi correlati all'immunità sono ampiamente rappresentati: abbiamo notato che la *network* delle Caco-2, rispetto alle HCT-116, è arricchita in proteine coinvolte nell'attivazione dei mediatori molecolari di infiammazione. È stato riportato che il trattamento con Cetuximab dei pazienti CRC aumenta l'espressione di proteine pro-infiammatorie e che la risposta dell'ospite alla terapia potrebbe essere un potenziale fattore prognostico nel CRC (122). Inoltre nelle Caco-2, sia a 24h che a 48h, abbiamo trovato diversi GO *terms* relativi all'attività del complesso NF κ B, che sono assenti nelle HCT-116. L'espressione di questo fattore di trascrizione, anch'esso attivato da segnali a valle dell'EGFR, è stata associata con la prognosi e la resistenza ai trattamenti antitumorali in CRC e altri tumori solidi (130). Questi dati sottolineano come le diverse risposte al Cetuximab siano legate a diversi tipi di DE miRNA e, di conseguenza, a diverse vie di segnalazione molecolare. Infine, abbiamo identificato differenze statisticamente significative nelle GO tra le 24h e le 48h nelle nostre linee cellulari modello: a 24h, rispetto alle 48h, le Caco-2 hanno mostrato un'occorrenza significativamente maggiore dei processi biologici e delle funzioni molecolari correlate alla trasduzione del segnale, all'attività dei recettori transmembrana, vie di segnalazione attivate dalle proteine-G accoppiate a recettori. Ciò indica che il controllo della cascata molecolare

mediata da EGFR rappresenta un effetto precoce della somministrazione del Cetuximab nella linea cellulare sensibile, visibile già alle 24h.

5. CONCLUSIONI

I dati presentati in questa tesi evidenziano per la prima volta il coinvolgimento globale dei microRNA nella risposta al farmaco al cetuximab nel carcinoma al colon-retto, identificando un set di candidati trascrizionali per i quali è interessante studiare il coinvolgimento funzionale. I miRNA identificati attraverso i nostri esperimenti possiedono le seguenti caratteristiche: alcuni sono disregolati in maniera comune in entrambe le linee cellulari dopo trattamento (ad esempio, il miR-330-5p, sovraespresso, e il miR-610, sottoespresso); altri sono alterati specificamente in una linea e sono chiaramente correlati alla *pathway* del cetuximab (ad esempio nelle HCT-116 i miR let-7b e let-7e, sottoespressi e il miR-17*, sovraespresso). infine i più interessanti sono risultati i più abbondanti in pazienti con KRAS mutato prima del trattamento (cioè, miR-146b-3p e miR-486-5p). Ad oggi, la possibilità di un coinvolgimento dei miRNA nella risposta dei pazienti al cetuximab è rimasta inesplorata: i nostri dati forniscono per la prima volta una visione sistemica della partecipazione dei miRNA nella cascata molecolare innescata dal cetuximab, suggerendo anche il loro utilizzo come marcatori predittivi della risposta farmacologica. Ciò potrebbe aprire la strada a studi epidemiologici più grandi e ad applicazioni cliniche su campioni CRC per gli *screening* di farmacoresistenza nei pazienti, al fine di ricercare un'associazione tra specifici profili di miRNA e classi di risposta per cetuximab. L'identificazione di questi microRNA dovrebbe eventualmente consentire di prevedere la risposta dei pazienti alla terapia e potrebbe condurre ad una migliore comprensione dei meccanismi molecolari della risposta farmacologica. Infine, questi studi

potrebbero anche identificare miRNA connessi alla chemioresistenza come bersagli farmacologici per la combinazione della terapia con *antagomirs* (131).

BIBLIOGRAFIA

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009, 59:225-49.
2. Nicola S Fearnhead, Jennifer L Wilding and Walter F Bodmer. Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. *British Medical Bulletin* 2002, 64: 27–43
3. Derks S, Postman C, Carvalho B, van den Bosch SM, Moerkerk P, Herman JG, Weijnenberg MP, de Bruijne AP, Meijer GA and van Engeland M. Integrated analysis of chromosomal, microsatellite and epigenetic instability in colorectal cancer identifies specific associations between promoter methylation of pivotal tumour suppressor and DNA repair genes and specific chromosomal alterations. *Carcinogenesis* 2008 29: 434–439.
4. Mori Y, Yin J, Sato F, Sterian A, Simms L, Selaru F, Schulmann K, Xu Y, Oлару A, Wang S et al. Identification of genes uniquely involved in frequent microsatellite instability colon carcinogenesis by expression profiling combined with epigenetic scanning. *Cancer Res* 2004: 64: 2434–2438.
5. *AJCC Cancer Staging Manual (Sixth ed.)*. Springer-Verlag New York, Inc 2002
6. Ogino S, Kawasaki T, Kirkner GJ, Kraft P, Loda M and Fuchs CS. Evaluation of Markers CpG Island Methylator Phenotype (CIMP) in Colorectal Cancer by a Large Population-Based Sample. *J of Mol Diagnostics* 2007, 9:305-14.
7. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007, 50:113-30.

8. Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2009;9:489-99.
9. Reya T, Cervers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005, 434:843-50.
10. Peyssonnaud, C. and Eychene, A. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol. Cell* 2001, 93: 53–62.
11. Heinemann V, Stintzing S, Kirchner T, Boeck S and Jung A. Clinical relevance of EGFR- and KRAS-status in colorectal cancer patients treated with monoclonal antibodies directed against the EGFR. *Cancer Treat Rev* 2009, 35:262–271.
12. Munro AJ, Lain S, Lane DP. P53 abnormalities and outcomes in colorectal cancer: a system review. *Br J Cancer* 2005, 92:434-44.
13. Chan TL, Zhao W, Leung SY, Yuen ST; Cancer Genome Project. BRAF and KRAS mutations in colorectal hyperplastic polyps and serrated adenomas. *Cancer Res.* 2003 63:4878-81
14. Yuen ST, Davies H, Chan TL, Ho JW, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Tsui WW, Chan AS, et al. Similarity of the phenotypic patterns associated with BRAF and KRAS mutations in colorectal neoplasia. *Cancer Res.* 2002 62:6451-5.
15. Santarius T, Shipley J, Brewer D, Stratton MR, Cooper CS. A census of amplified and overexpressed human cancer genes. *Nat Rev Cancer* 2010, 10:59-64
16. He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005, 435:828-33.
17. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007, 445:111-5.
18. Salmena L, Carracedo A, Pandolfi PP. Tenets of PTEN tumor suppression. *Cell* 2008,133:403-14.

19. Orloff MS, Eng C. Genetic and phenotypic heterogeneity in the PTEN hamartoma tumour syndrome. *Oncogene*. 2008, 27:5387-97.
20. Jhawer M, Goel S, Wilson AJ, Montagna C, Ling YH, Byun DS, Nasser S, Arango D, Shin J, Klampfer L, et al. PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab. *Cancer Res*. 2008;68:1953-61
21. Bardelli A, Siena S. Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28:1254-61.
22. Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjöblom T, Leary RJ, Shen D, Boca SM, Barber T, Ptak J, et al. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science*. 2007, 318:1108-13.
23. Tenesa A, Dunlop MG. New insights into the aetiology of colorectal cancer from genome-wide association studies. *Nat Rev Genet*. 2009, 10:353-8.
24. Matar P, Rojo F, Cassia R, Moreno-Bueno G, Di Cosimo S, Tabernero J, Guzmán M, Rodríguez S, Arribas, Palacio J, and Baselga J. Combined Epidermal Growth Factor Receptor Targeting with the Tyrosine Kinase Inhibitor Gefitinib (ZD1839) and the Monoclonal Antibody Cetuximab (IMC-C225): Superiority Over Single-Agent Receptor Targeting. *Clinical Cancer Res* 2004, 10:6487–6501.
25. Garassino MC, Borgonovo K, Rossi A, Mancuso A, Martelli O, Tinazzi A, Di Cosimo S, La Verde N, Sburlati P, Bianchi C et al. Biological and clinical features in predicting efficacy of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *Anticancer Res*. 2009, 29:2691-701.
26. Ponz-Sarvisé M, Rodríguez J, Viudez A, Chopitea A, Calvo A, García-Foncillas J, Gil-Bazo I. Epidermal growth factor receptor inhibitors in colorectal cancer treatment: what's new? *World J Gastroenterol*. 2007, 13:5877-87

27. Vincenzi B, Schiavon G, Silletta M, Santini D, Tonini G. The biological properties of cetuximab. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008, 68:93-106.
28. Zhang O, Chen G, Liu X, Qian Q. Monoclonal antibodies as therapeutic agents in oncology and antibody gene therapy. *Cell Research* 2007 17: 89-99.
29. Strimpakos AS, Syrigos KN and Saif MW. Pharmacogenetics and biomarkers in colorectal Cancer. *The Pharmacogenomics Journal* 2009, 9:147–160.
30. Lievre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, Ychou M, Bouché O, Landi B, Louvet C et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2008;26:374–9
31. Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Zanon C, Moroni M, Veronese S, Siena S, Bardelli A. Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res* 2007;67:2643–8.
32. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, De Dosso S, Mazzucchelli L, Frattini M, Siena S, Bardelli A. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008, 26:5705-12.
33. Wheeler DL, Dunn EF, Harari PM. Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies. *Nat Rev Clin Oncol.* 2010, 7:493-507.
34. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J,* 2004; 23:4051–4060
35. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA,* 2004; 10:1957–1966

36. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol.* 2006 13:1097-101.
37. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 2004;303, 95–98
38. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, 2001;293:834–838
39. Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev*, 2001;15:2654–2659
40. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* 2008, 9:102-14.
41. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 2003 115:199–208
42. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with big role in gene regulation. *Nature Rev Genet*, 2002; 5:522-531
43. Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature.* 2007, 448:83-6.
44. Nielsen CB et al. Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. *RNA* , 2007; 13:1894–1910
45. Easow G, Teleman AA, Cohen SM. Isolation of microRNA targets by miRNP immunopurification. *RNA.* 2007, 13:1198-204
46. Huang J, Liang Z, Yang B, Tian H, Ma J, Zhang H. Derepression of microRNA-mediated protein translation inhibition by apolipoprotein B

- mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) and its family members. *J Biol Chem.* 2007, 282:33632-40.
47. Schratt GM, Tuebing F, Nigh EA, Kane CG, Sabatini ME, Kiebler M, Greenberg ME. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature.* 2006, 439:283-9
48. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature.* 2005, 435:839-43.
49. Conaco C, Otto S, Han JJ, Mandel G. Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006, 103:2422-7.
50. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet.* 2010, 11:597-610.
51. Paroo Z, Ye X, Chen S, Liu Q. Phosphorylation of the human microRNA-generating complex mediates MAPK/Erk signaling. *Cell.* 2009, 139:112-22.
52. Krol J, Busskamp V, Markiewicz I, Stadler MB, Ribl S, Richter J, Duebel J, Bicker S, Fehling HJ, Schübeler D, et al. Characterizing light-regulated retinal microRNAs reveals rapid turnover as a common property of neuronal microRNAs. *Cell.* 2010, 141:618-31.
53. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004, 101:2999-3004.
54. Gaur A, Jewell DA, Liang Y, Ridzon D, Moore JH, Chen C, Ambros VR, and Israel MA. Characterization of MicroRNA Expression Levels

- and Their Biological Correlates in Human Cancer Cell Lines. *Cancer Res* 2007, 67:2456-68.
55. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 2005, 120:635–47.
56. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006, 6:259-69.
57. Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet*. 2009, 10:704-14.
58. Brown BD, Naldini L. Exploiting and antagonizing microRNA regulation for therapeutic and experimental applications. *Nat Rev Genet*. 2009, 10:578-85.
59. Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, Wentzel EA, Montgomery CL, Hwang HW, Chang TC, Vivekanandan P, Torbenson M, Clark KR et al. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell*. 2009, 137:1005-17.
60. Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanesi N, Callegari E, Liu S, Alder H, Costinean S, Fernandez-Cymering C, et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007,104:15805-10.
61. Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, Rosenwald S, Spector Y, Zepeniuk M, Benjamin H, Shabes N, Tabak S, Levy A, et al. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat Biotechnol*. 2008 26:462-9.
62. Blenkiron C, Goldstein LD, Thorne NP, Spiteri I, Chin SF, Dunning MJ, Barbosa-Morais NL, Teschendorff AE, Green AR, Ellis IO et al. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol*. 2007;8(10):R214.
63. Cummins JM, He Y, Leary RJ, Pagliarini R, Diaz LA Jr, Sjoblom T, Barad O, Bentwich Z, Szafranska AE, Labourier E et al. The colorectal microRNAome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006,103:3687-92.

64. Bandrés E, Cubedo E, Agirre X, Malumbres R, Zárate R, Ramirez N, Abajo A, Navarro A, Moreno I, Monzó M and García-Foncillas J. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Molecular Cancer* 2006, 5:29
65. Lanza G, Ferracin M, Gafa R, Veronese A, Spizzo R, Pichiorri F, Liu CG, Calin GA, Croce CM, Negrini M. mRNA/microRNA gene expression profile in microsatellite unstable colorectal cancer. *Mol Cancer* 2007, 6:54.
66. Sarver AL, French AJ, Borralho PM, Thayanithy V, Oberg AL, Silverstein KA, Morlan BW, Riska SM, Boardman LA, Cunningham JM, et al. Human colon cancer profiles show differential microRNA expression depending on mismatch repair status and are characteristic of undifferentiated proliferative states. *BMC Cancer*. 2009, 9:401.
67. Schepeler T, Reinert JT, Ostensfeld MS, Christensen LL, Silahdaroglu AN, Dyrskjot L, Wiuf C, Sørensen FJ, Kruhøffer M, Laurberg S et al. Diagnostic and prognostic microRNAs in stage II colon cancer. *Cancer Res*. 2008, 68:6416-24.
68. Arndt GM, Dossey L, Cullen LM, Lai A, Druker R, Eisbacher M, Zhang C, Tran N, Fan H, Retzlaff K et al. Characterization of global microRNA expression reveals oncogenic potential of miR-145 in metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2009, 9:374.
69. Zhang J, Guo H, Qian G, Ge S, Ji H, Hu X, Chen W. MiR-145, a new regulator of the DNA fragmentation factor-45 (DFF45)-mediated apoptotic network. *Mol Cancer*. 2010, 9:211.
70. Gregersen LH, Jacobsen AB, Frankel LB, Wen J, Krogh A, Lund AH. MicroRNA-145 targets YES and STAT1 in colon cancer cells. *PLoS One*. 2010, 5:e8836.
71. Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman ED, Yanaihara N, Yuen ST, Chan TL, Kwong D, Au G, et al. MicroRNA Expression Profiles Associated With Prognosis and Therapeutic Outcome in Colon Adenocarcinoma. *JAMA*. 2008, 299: 425–436.

72. Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* 2007, 26: 2799–2803.
73. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 2008,18:997-1006.
74. Lodes MJ, Caraballo M, Suci D, Munro S, Kumar A, Anderson B. Detection of cancer with serum miRNAs on an oligonucleotide microarray. *PLoS One.* 2009,4:e6229.
75. Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods.* 2010, 50:298-301.
76. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008, 105:10513-8.
77. Ng EK, Chong WW, Jin H, Lam EK, Shin VY, Yu J, Poon TC, Ng SS, Sung JJ. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut.* 2009, 58:1375-81.
78. Huang Z, Huang D, Ni S, Peng Z, Sheng W, Du X. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2010, 127:118-26.
79. Fontana L, Fiori ME, Albini S, Cifaldi L, Giovinazzi S, Forloni M, Boldrini R, Donfrancesco A, Federici V, Giacomini P et al. Antagomir-17-5p abolishes the growth of therapy-resistant neuroblastoma through p21 and BIM. *PLoS One.* 2008, 3:e2236.
80. Wright AF, Hastie ND. Complex genetic diseases: controversy over the Croesus code. *Genome Biol.* 2001, 2(8).
81. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 1996, 273: 1516-1517 .

82. Hornberg JJ, Bruggeman FJ, Westerhoff HV, Lankelma J. Cancer: a Systems Biology disease. *Biosystems* 2006, 83: 81-90.
83. Hartwell LH, Hopfield JJ, Leibler S, Murray AW. From molecular to modular cell biology. *Nature* 1999, 402(6761 Suppl): C47-52.
84. Oltvai ZN, Barabasi AL. Systems biology. Life's complexity pyramid. *Science* 2002, 298: 763-4.
85. Spivey A. Systems biology: the big picture. *Environ Health Perspect.* 2004, 112(16): 938-43-
86. Bray D. Molecular networks: the top-down view. *Science* 2003, 301: 1864-5.
87. Kitano H. Systems biology: a brief overview. *Science* 2002, 295: 1662-4.
88. Huang S. Back to the biology in systems biology: what can we learn from biomolecular networks? *Brief Funct Genomic Proteomic* 2004, 2(4): 279-97.
89. Borodina I, Nielsen J. From genomes to in silico cells via metabolic networks. *Curr Opin Biotechnol.* 2005, 16(3): 350-5.
90. Rosenfeld N, Elowitz MB, Alon U. Negative autoregulation speeds the response times of transcription networks. *J Mol Biol.* 2002, 323:785-93.
91. Barabasi AL, Albert R. Emergence of scaling in random networks. *Science.* 1999, 286:509-12
92. Yamada T, Bork P. Evolution of biomolecular networks: lessons from metabolic and protein interactions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009, 10:791-803.
93. Jeong H, Mason SP, Barabási AL, Oltvai ZN. Lethality and centrality in protein networks. *Nature.* 2001, 411:41-2.
94. Di Pietro C, Ragusa M, Barbagallo D, Duro LR, Guglielmino MR, Majorana A, Angelica R, Scalia M, Statello L, Salito L et al. The apoptotic machinery as a biological complex system: analysis of its omics and evolution, identification of candidate genes for fourteen major types of cancer, and experimental validation in CML and neuroblastoma. *BMC Med Genomics.* 2009, 2:20.

95. Ragusa M, Avola G, Angelica R, Barbagallo D, Guglielmino MR, Duro LR, Majorana A, Statello L, Salito L, Consoli C, et al. Expression profile and specific network features of the apoptotic machinery explain relapse of acute myeloid leukemia after chemotherapy. *BMC Cancer*. 2010;10:377.
96. Walhout AJ, Reboul J, Shtanko O, Bertin N, Vaglio P, Ge H, Lee H, Doucette-Stamm L, Gunsalus KC, Schetter AJ, et al. Integrating interactome, phenome, and transcriptome mapping data for the *C. elegans* germline. *Curr Biol* 2002, 12: 1952-8.
97. Joyce AR, Palsson BO. The model organism as a system: integrating 'omics' data sets. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, 7: 198-210.
98. Chen LL, Blumm N, Christakis NA, Barabási AL, Deisboeck TS. Cancer metastasis networks and the prediction of progression patterns. *Br J Cancer*. 2009, 101:749-58.
99. Hidalgo CA, Blumm N, Barabási AL, Christakis NA. A dynamic network approach for the study of human phenotypes. *PLoS Comput Biol*. 2009, 5:e1000353.
100. Bandrés E, Cubedo E, Agirre X, Malumbres R, Zárata R, Ramirez N, Abajo A, Navarro A, Moreno I, Monzó M, García-Foncillas J. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol Cancer*. 2006, 5:29.
101. Ruike Y, Ichimura A, Tsuchiya S, Shimizu K, Kunimoto R, Okuno Y, Tsujimoto G. Global correlation analysis for micro-RNA and mRNA expression profiles in human cell lines. *J Hum Genet* 2008;53:515-23.
102. Liang Y, Ridzon D, Wong L, Chen C. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics* 2007;8:166.
103. Bertram J, Palfner K, Hiddemann W, Kneba M. Overexpression of ribosomal proteins L4 and L5 and the putative alternative elongation factor PTI-1 in the doxorubicin resistant human colon cancer cell line LoVoDxR. *Eur J Cancer* 1998;34:731-6.

104. Zhong D, Zhang J, Yang S, Soh UJ, Buschdorf JP, Zhou YT, Yang D, Low BC. The SAM domain of the RhoGAP DLC1 binds EF1A1 to regulate cell migration. *J Cell Sci* 2009;122:414-24
105. Thornton S, Anand N, Purcell D, Lee J. Not just for housekeeping: protein initiation and elongation factors in cell growth and tumorigenesis. *J Mol Med* 2003;81:536-48.
106. Fulda S. Tumor resistance to apoptosis. *Int J Cancer* 2009;124:511-5.
107. Damia G, D'Incalci M. Targeting DNA repair as a promising approach in cancer therapy. *Eur J Cancer* 2007;43:1791-801.
108. Weiner LM, Dhodapkar MV, Ferrone S. Monoclonal antibodies for cancer immunotherapy. *Lancet* 2009;373:1033-40.
109. Vincenzi B, Schiavon G, Silletta M, Santini D, Tonini G. The biological properties of cetuximab. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;68:93-106.
110. Vincenzi B, Zoccoli A, Pantano F, Venditti O, Galluzzo S. Cetuximab: From Bench to Bedside. *Curr Cancer Drug Targets* 2010;10:80-95.
111. Zheng T, Wang J, Chen X, Liu L. Role of microRNA in anticancer drug resistance. *Int J Cancer* 2010;126:2-10.
112. Valeri N, Croce CM, Fabbri M. Pathogenetic and clinical relevance of microRNAs in colorectal cancer. *Cancer Genomics Proteomics* 2009;6:195-204.
113. Slaby O, Svoboda M, Michalek J, Vyzula R. MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application. *Mol Cancer*. 2009;8:102.
114. Zhang W, Winder T, Ning Y, et al. A let-7 microRNA-binding site polymorphism in 3'-untranslated region of KRAS gene predicts response in wild-type KRAS patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab monotherapy. *Ann Oncol Epub* 2010 Jul 5.
115. Hovanes K, Li TW, Munguia JE, Truong T, Milovanovic T, Lawrence Marsh J, Holcombe RF, Waterman ML. Beta-catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer. *Nat Genet*. 2001, 28:53-7.

- 116.Kohno K, Uchiumi T, Niina I, Wakasugi T, Igarashi T, Momii Y, Yoshida T, Matsuo K, Miyamoto N, Izumi H. Transcription factors and drug resistance. *Eur J Cancer*. 2005, 41:2577-86.
- 117.Wang YP, Li KB. Correlation of expression profiles between microRNAs and mRNA targets using NCI-60 data. *BMC Genomics* 2009;10:218.
- 118.Gen Y, Yasui K, Zen K, Nakajima T, Tsuji K, Endo M, Mitsuyoshi H, Minami M, Itoh Y, Tanaka S, et al. A novel amplification target, ARHGAP5, promotes cell spreading and migration by negatively regulating RhoA in Huh-7 hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett* 2009;275:27-34.
- 119.Caspi E, Rosin-Arbesfeld R. A novel functional screen in human cells identifies MOCA as a negative regulator of Wnt signaling. *Mol Biol Cell* 2008;19:4660-74.
- 120.Miyasaka T, Morita M, Ito K, Suzuki T, Fukuda H, Takeda S, Inoue J, Semba K, Yamamoto T. Interaction of antiproliferative protein Tob with the CCR4-NOT deadenylase complex. *Cancer Sci* 2008;99:755-61.
- 121.Majidi M, Gutkind JS, Lichy JH. Deletion of the COOH terminus converts the ST5 p70 protein from an inhibitor of RAS signaling to an activator with transforming activity in NIH-3T3 cells. *J Biol Chem* 2000;275:6560-5.
- 122.Debucquoy A, Haustermans K, Daemen A, Aydin S, Libbrecht L, Gevaert O, De Moor B, Tejpar S, McBride WH, Penninckx F, et al. Molecular response to cetuximab and efficacy of preoperative cetuximab-based chemoradiation in rectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009, 27:2751-7.
- 123.Patnaik SK, Kannisto E, Knudsen S, Yendamuri S. Evaluation of microRNA expression profiles that may predict recurrence of localized stage I non-small cell lung cancer after surgical resection. *Cancer Res* 2010;70:36-45

- 124.Chen YT, Kitabayashi N, Zhou XK, Fahey TJ, 3rd, Scognamiglio T. MicroRNA analysis as a potential diagnostic tool for papillary thyroid carcinoma. *Mod Pathol* 2008;21:1139-46.
- 125.Chou CK, Chen RF, Chou FF, Chang HW, Chen YJ, Lee YF, Yang KD, Cheng JT, Huang CC, Liu RT I. miR-146b is highly expressed in adult papillary thyroid carcinomas with high risk features including extrathyroidal invasion and the BRAF(V600E) mutation. *Thyroid* 2010;20:489-94.
- 126.Hurst DR, Edmonds MD, Scott GK, Benz CC, Vaidya KS, Welch DR. Breast cancer metastasis suppressor 1 up-regulates miR-146, which suppresses breast cancer metastasis. *Cancer Res* 2009;69:1279-83.
- 127.Voutsadakis IA. The ubiquitin-proteasome system in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta* 2008;1782:800-8.
- 128.Giubellino A, Burke TR, Jr., Bottaro DP. Grb2 signaling in cell motility and cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2008;12:1021-33
- 129.MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 2009;17:9-26.
- 130.Scartozzi M, Bearzi I, Pierantoni C, Mandolesi A, Loupakis F, Zaniboni A, Catalano V, Quadri A, Zorzi F, Berardi R et al. Nuclear factor-kB tumor expression predicts response and survival in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab-irinotecan therapy. *J Clin Oncol* 2007;25:3930-5.
- 131.Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 2005;438:685-9