



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

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

**DIPARTIMENTO DI ANATOMIA, PATOLOGIA DIAGNOSTICA,
MEDICINA LEGALE, IGIENE E SANITÀ PUBBLICA**

G.F. INGRASSIA

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

Dott.ssa Loredana Salito

**Genomica strutturale e funzionale del miR-671 e del suo gene
ospite CHPF2: potenziale coinvolgimento patogenetico nel
Glioblastoma Multiforme**

Tesi di Dottorato

Coordinatore e Tutor:
Chiar.mo Prof. MICHELE PURRELLO

Anno Accademico 2011 - 2012

INDICE

RIASSUNTO	1
1. INTRODUZIONE	4
1.1 <i>miRNA</i>	4
1.2 EVOLUZIONE DELLA VARIETA' E DELLA REGOLAZIONE DEI miRNA NEGLI ANIMALI	5
1.3 DISTRIBUZIONE FILOGENETICA DEI miRNA	6
1.4 ORIGINE GENOMICA DI NUOVI GENI miRNA	7
1.5 ORGANIZZAZIONE GENOMICA E STRUTTURA GENICA DEI miRNA	9
1.6 miRNA E GENI OSPITI	10
1.7 BIOGENESI DEI miRNA	12
1.8 REGOLAZIONE POST-TRASCRIZIONALE MEDIATA DAI miRNA	16
1.9 GENI <i>TARGET</i> DEI miRNA	18
1.10 REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA DEI miRNA	19
1.11 CORRELAZIONE TRA L'ESPRESSIONE DEI miRNA ED I GENI DI SECONDA CLASSE	22
1.12 miRNA: RUOLO FISILOGICO E PATOLOGICO	23
1.12.1 CAUSE E CONSEGUENZE DELLA ALTERATA ESPRESSIONE DEI miRNA NEI TUMORI	23
1.13 PROTEOGLICANI E CHPF2: RUOLO FISILOGICO E PATOLOGICO	26

1.14 IL GLIOBLASTOMA MULTIFORME	29
1.14.1 CLASSIFICAZIONE DEI GLIOMI	29
1.14.2 PATOLOGIA E CARATTERISTICHE CLINICHE DEI GLIOMI	32
1.14.3 GENETICA DEL GLIOBLASTOMA MULTIFORME	34
1.14.4 BASI MOLECOLARI DELLA RESISTENZA ALLA CHEMIOTERAPIA	37
1.14.5 NUOVI PROGRESSI NELLA CLASSIFICAZIONE DEL GLIOBLASTOMA UMANO	39
1.14.6 NUOVI SVIUPPI NELLA TERAPIA ANTITUMORALE SPECIFICA PER IL GBM	41
1.14.7 TERAPIE MOLECOLARI APPLICATE AL TRATTAMENTO DEL GLIOBLASTOMA MULTIFORME	43
1.15 miRNA E GLIOBLASTOMA; THE STEM CELL CONNECTION	47
1.15.1 CELLULE STAMINALI E GLIOBLASTOMA	47
1.15.2 ALTERAZIONI DEI miRNA NEL GLIOBLASTOMA MULTIFORME	49
2. MATERIALI E METODI	51
2.1 COLTURE CELLULARI	51
2.2 REAL TIME PCR	51
2.2.1 QUANTIFICAZIONE MEDIANTE SYBR GREEN	53
2.2.2 QUANTIFICAZIONE MEDIANTE IL SAGGIO <i>TaqMan</i>	54
2.3 MAPPATURA COMPUTAZIONALE DEL GENE CODIFICANTE IL MIR-671 ALL'INTERNO DEL QUARTO ESONE DEL GENE CHPF2	55
2.4 ANALISI EVOLUTIVA DEL GENE CHPF2 E DEL miR-671	56
2.5 IDENTIFICAZIONE COMPUTAZIONALE DI QUATTRO ISOFORME DI RNA MESSAGGERO CODIFICANTI CHPF2	57

2.6 ESPRESSIONE DELLE ISOFORME DI mRNA DEL GENE CHPF2 SINTETIZZATE IN DIVERSI TESSUTI ED ORGANI	57
2.7 VALIDAZIONE SPERIMENTALE E SEQUENZIAMENTO DELL'ISOFORMA <i>SHORT</i>	59
2.8 ANALISI <i>WESTERN</i>	60
2.8.1 VALIDAZIONE DI CHPF2 A LIVELLO PROTEICO	60
2.9 ESPRESSIONE DEI miR-671-5p E -3p IN UN PANNELLO DI TESSUTI E ORGANI	61
2.10 PROCEDURA ANALITICA STATISTICA DEI DATI DI ESPRESSIONE GENICA DI CHPF2 E DEL MIR-671	62
2.10.1 DATI DI ESPRESSIONE DEL miRNA E DEL GENE CHPF2	63
2.11 PREDIZIONE DEI <i>TARGETS</i> E ANALISI DELLE <i>GENE</i> <i>ONTOLOGIES</i>	63
2.12 IPOTETICO <i>TARGETING</i> DEL miRNA NEI CONFRONTI DEL GENE OSPITE CHPF2: PREDIZIONE CON IL <i>TOOL</i> RNA22	65
2.13 IDENTIFICAZIONE <i>IN SILICO</i> DEI SITI DI LEGAME (<i>TFBSs</i>) DI FATTORI DI TRASCRIZIONE	65
2.14 ANALISI DELLE <i>NETWORKS</i>	65
2.15 ANALISI DELLA REGIONE 7q36.1: APPROCCIO DEL <i>GENE CANDIDATO</i>	66
2.16 <i>PROFILING</i> DELL'ESPRESSIONE DI CHPF2 E DEI miR- 671-5p E miR-671-3p IN BIOPSIE PARAFFINATE DI GLIOBLASTOMA MULTIFORME	66
2.17 MODULAZIONE <i>IN VITRO</i> DELL'ESPRESSIONE DEI miR-671-5p E miR-671-3p	67

3. RISULTATI	69
GENOMICA	69
3.1 SOVRAPPOSIZIONE DEL miR-671 AL TRATTO CODIFICANTE DEL GENE OSPITE CHPF2	69
3.2 ANALISI EVOLUTIVA DEL GENE OSPITE CHPF2 E DEL GENE miR-671	70
TRASCRIPTOMA	74
3.3 ANALISI DELLE <i>EXPRESSED SEQUENCE TAGs (ESTs)</i> E IDENTIFICAZIONE DI QUATTRO ISOFORME TRASCRIZIONALI DI CHPF2	74
3.4 ESPRESSIONE DELLE ISOFORME DEL GENE CHPF2 SINTETIZZATE IN DIVERSI TESSUTI ED ORGANI	75
3.5 VALIDAZIONE DI CHPF2 A LIVELLO PROTEICO	78
3.6 ESPRESSIONE DEI miR-671-5p E -3p IN UN PANNELLO DI TESSUTI E ORGANI	79
3.7 ANALISI STATISTICA DEI DATI DI ESPRESSIONE GENICA	80
3.8 ANALISI DEI <i>TARGETS</i> E DELLE <i>GENE ONTOLOGIES</i>	80
3.9 IPOTESI DEL <i>TARGETING</i> DEL miRNA SUL GENE OSPITE CHPF2: PREDIZIONE CON IL <i>TOOL RNA2</i>	83
3.10 IDENTIFICAZIONE DEI TFBSs	87
3.11 ANALISI DELLE <i>NETWORKS</i>	90
3.12 ANALISI DELLA REGIONE 7q36.1: APPROCCIO AL GENE CANDIDATO	93
3.13 <i>PROFILING</i> DI CHPF2 E DEI miR-671-5p E miR-671-3p SU BIOPSIE PARAFFINATE DI GLIOBLASTOMA MULTIFORME	94
3.14 MODULAZIONE <i>IN VITRO</i> DELL'ESPRESSIONE DEI miR-671-5p E miR-671-3p	95

4. DISCUSSIONE	98
5. CONCLUSIONI	104
BIBLIOGRAFIA	106

RIASSUNTO

PREMESSA

Il 52.1% dei geni codificanti i microRNA (geni miRNA) è situato in regioni intergeniche del genoma umano, il 42.6% ricade all'interno di introni di geni codificanti proteine, mentre soltanto il 5.3% è localizzato negli esoni di questi geni. Effettuando una ricerca sulla localizzazione genomica dei geni miRNA umani nel *database miRBase*, la nostra attenzione si è focalizzata sull'hsa-premiR-671, la cui sequenza codificante sembra essere contenuta all'interno del quarto esone del gene della 2° classe CHPF2 (*Chondroitin Sulfate Glucoronyltransferase2, CSGLCAT*), che codifica la proteina omonima.

RISULTATI

Determinazione della localizzazione genomica delle sequenze codificanti i miR-671-5p e miR-671-3p all'interno del gene CHPF2

Il segmento codificante il premiR-671 (lungo 118 nucleotidi) si estende dalla posizione 3572 alla 3690, all'interno della porzione codificante del quarto esone di CHPF2; le coordinate genomiche del premiR-671 sono reperibili in *miRBase* (chr. 7q36.1, nt. 7: 150935507-150935624 [+]) e fanno riferimento alla sequenza del genoma umano depositata in *ENSEMBL* (Assembly GRCh37.p5).

Correlazione tra l'espressione di CHPF2 e dei miR-671-5p e miR-671-3p

Attraverso l'analisi di *Expressed Sequence Tags (ESTs)* abbiamo identificato quattro diverse isoforme di mRNA codificate dal gene CHPF2 (*Long1*, *Long2*, *Short*, *Monoexonic*) ed abbiamo validato sperimentalmente due di queste varianti trascrizionali: *Short* (mediante PCR semiquantitativa e sequenziamento) e *Monoexonic* (mediante *Real Time PCR*). L'espressione di

CHPF2 e dei miR-671-5p e miR-671-3p è stata analizzata mediante un pannello di diciannove differenti organi e tessuti ed ha evidenziato una tendenziale anticorrelazione tra la variante trascrizionale *Long2* di CHPF2 ed il miR-671-3p. Mediante modulazione *in vitro* del pre-miR-671-3p e dell'anti-miR-671-3p in cellule di Glioblastoma U87MG abbiamo confermato questo rapporto, sia a livello del trascritto che della proteina.

Alterazione della struttura genomica dei geni CHPF2, miR-671-5p, miR-671-3p e del loro stato di metilazione nel Glioblastoma Multiforme

Il gene CHPF2, assieme a quelli codificanti i miR-671-5p e miR-671-3p contenuti al suo interno, è localizzato nella regione q36.1 del cromosoma umano 7. Questa regione è soggetta a frequenti alterazioni strutturali di tipo *gain* in diverse neoplasie. Utilizzando l'approccio del *gene candidato posizionale*, abbiamo identificato e caratterizzato alterazioni della struttura e della espressione di CHPF2 nel Glioblastoma Multiforme (GBM), un tumore maligno costituito da cellule di origine gliale e caratterizzato da riarrangiamenti strutturali della regione 7q36.1. Nelle ventinove biopsie GBM analizzate abbiamo rilevato una sottoespressione di CHPF2 rispetto ad un controllo normale (PC1). Anche i miR-671-5p ed 671-3p sono sottoespressi nelle stesse biopsie; in particolare, abbiamo dimostrato che la modulazione negativa del miR-671-3p è quantitativamente omogenea in tutte le biopsie analizzate. L'analisi del profilo di metilazione di CHPF2, miR-671-5p e miR-671-3p nel GBM è stata effettuata in campioni paraffinati di alcune delle ventinove biopsie GBM citate in precedenza, ma non ha evidenziato l'esistenza di metilazione nel locus CHPF2.

Networks biologiche

Lo studio dei *targets* predetti del miR-671-5p, del miR-671-3p e delle relative *networks* biologiche ha consentito di identificare diverse *pathways*, correlate al processo neoplastico e potenzialmente regolate dai due miRNA. L'ulteriore studio di questi fenomeni dovrebbe contribuire a chiarire ulteriormente le basi

molecolari del GBM e confermare il coinvolgimento patogenetico dei miR-671-5p e miR-671-3p in questa neoplasia.

PROSPETTIVE FUTURE

Il nostro gruppo si propone di verificare sperimentalmente se: (1) il tratto genomico codificante i miR-671-5p e miR-671-3p sia deletato nelle biopsie GBM analizzate; (2) se il gene CHPF2, ed in particolare le sue isoforme mRNA *Long 1* e *Long 2*, possano essere considerate *targets* dei miR-671-3p e miR-671-5p: per questa indagine verrà utilizzato il test della luciferasi. Se questa ipotesi dovesse essere confermata, intendiamo verificare tramite mutagenesi sito-specifica se la *coding sequence* di CHPF2 sia la regione di effettivo *targeting*.

1. INTRODUZIONE

1.1 *miRNA*

I microRNA (miRNA) costituiscono un esteso gruppo di piccoli RNA endogeni, non codificanti ed a singolo filamento (ss), di lunghezza compresa tra i 21 e i 25 nucleotidi; il loro ruolo fondamentale negli animali e nelle piante è quello di regolare negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale. Più precisamente, essi agiscono come regolatori negativi poiché sono in grado di legare attraverso una specifica regione (*seed*) il 3' UTR del mRNA *target* e di determinare la sua degradazione oppure l'inibizione della traduzione, a seconda che la complementarietà (*match*) tra il miRNA ed il *target* sia perfetta o meno. Inoltre, condizione necessaria affinché il miRNA possa svolgere il suo ruolo biologico è che la sequenza *target* sia facilmente accessibile al miRNA stesso: una elevata energia di legame tra l'mRNA ed il miRNA può inibire il fenomeno del silenziamento genico malgrado l'alto grado di *matching* tra le due sequenze [1]. Da un punto di vista funzionale è stato dimostrato che esistono numerosi miRNA capaci di riconoscere più *targets*, e che molti mRNA 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: queste spaziano da quelle prettamente cellulari (ad esempio, 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. 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 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 [2].

1.2 EVOLUZIONE DELLA VARIETA' E DELLA REGOLAZIONE DEI miRNA NEGLI ANIMALI

L'origine antica dei miRNA e la loro significativa espansione in animali a simmetria bilaterale suggeriscono che essi siano stati fondamentali nell'evoluzione della complessità degli organismi. Progressi nella comprensione della loro funzione biologica, combinati con l'aumentata disponibilità di diversi genomi sequenziati, hanno iniziato a rivelare i meccanismi molecolari che sono alla base della loro evoluzione e di quella dei loro *targets*. Risultati rilevanti stanno emergendo anche sul ruolo delle *networks* regolatorie, contenenti i miRNA, nella evoluzione della complessità dell'organismo. Sebbene il primo miRNA sia stato scoperto nel 1993 [3, 4], fu compreso solamente dopo alcuni anni che i miRNA erano di notevole importanza nel regno animale poiché rappresentavano un nuovo livello di regolazione genica: questi dati forzarono i ricercatori a *riorganizzare la via dell'universo* [5]. Tanti progressi sono stati fatti dopo aver compreso la biologia dei miRNA: (1) l'identificazione di centinaia di geni miRNA; (2) la caratterizzazione delle *pathways* coinvolte nella biogenesi dei miRNA; (3) l'identificazione di numerosi *targets* dei miRNA; (4) la comprensione di diversi principi sulla regolazione dei geni *target*; (5) la comprensione del ruolo critico dei miRNA nella regolazione della espressione genica [6].

1.3 DISTRIBUZIONE FILOGENETICA DEI miRNA

Il primo gene miRNA ad essere scoperto, *lin-4* in *Caenorhabditis elegans* [3, 4], sembrò essere specifico dei vermi. In seguito, si dimostrò che il secondo miRNA identificato nello stesso organismo, *let-7* [7], era conservato anche in altri metazoi (nei vermi, uccelli ed uomo) [8]. A questa scoperta se ne aggiunsero altre, che dimostrarono la presenza di geni miRNA nei genomi di *C. elegans*, *Drosophila melanogaster* ed uomo [9, 10]. Con lo sviluppo dei metodi di sequenziamento *high-throughput* di nuova generazione, il cosiddetto “*deep sequencing*” dei piccoli RNA seguito dall’analisi computazionale, è diventato *de facto* l’approccio per la scoperta dei miRNA. Alternativamente, per indagare la presenza di geni miRNA conservati nelle diverse specie, possono essere usati l’analisi *northern* e l’ibridazione *in situ*, sebbene con minore sensibilità rispetto ai metodi basati sul sequenziamento e con un grado più elevato di incertezza (dovuto ad un potenziale *annealing* non specifico legato ai metodi basati sull’ibridazione molecolare). Usando sia l’approccio del sequenziamento dei piccoli RNA che quello della analisi *northern* e dell’ibridazione *in situ*, gli studi sulla distribuzione dei miRNA nel regno animale hanno rivelato parecchi dati rilevanti: (A) i miRNA sono regolatori dell’espressione genica presenti già dall’inizio dell’evoluzione degli animali (per esempio, il miR-100 è stato ritrovato a livello degli Eumetazoi); (B) la conservazione di un set di 34 miRNA in protostomi e deuterostomi suggerisce un’espansione bilaterale alla base del *lineage* di questi organismi; (C) un incremento del numero di geni miRNA è stato osservato alla base del *lineage* dei Vertebrati ed in quello che ha originato i mammiferi placentari (**Figura 1**) [11, 12]; (D) infine, la distribuzione dei miRNA conservati indica che, dopo che un miRNA compare in una particolare famiglia (*lineage*), è raro che venga perso nella famiglia discendente. In combinazione con questo scarso ritmo di perdita, una continua acquisizione di nuovi miRNA ha portato ad un’amplificazione numerica di questi ultimi nel corso dell’evoluzione. In particolare, c’è una diretta correlazione tra il numero dei miRNA e la

complessità morfologica, suggerendo che la comparsa dei geni miRNA sia stata un fattore importante nell'evoluzione degli organismi complessi.

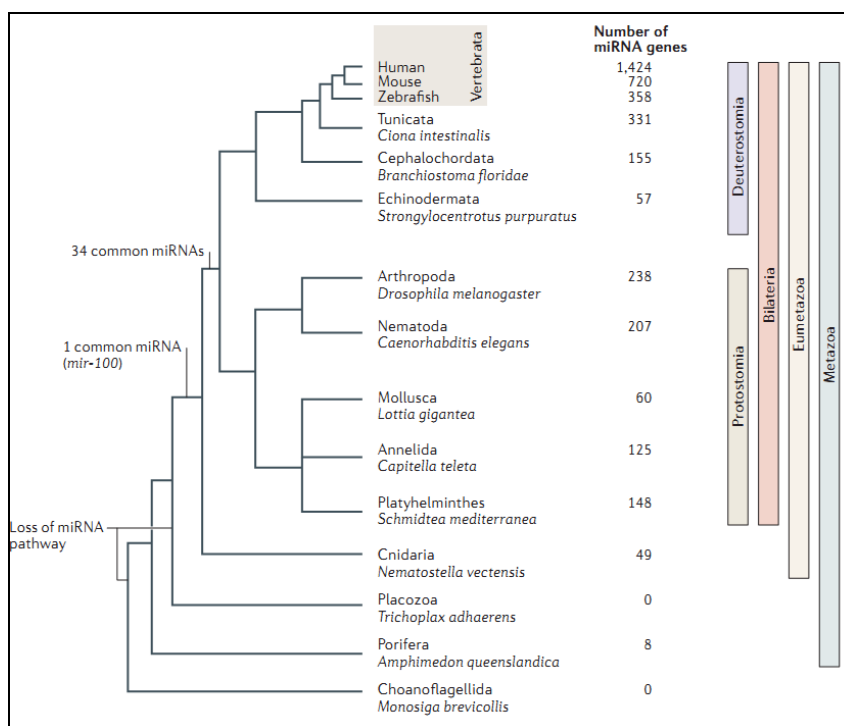


Figura 1. Distribuzione dei geni miRNA nel regno animale (da Berezikov, NAT REV GENETICS 2011).

1.4 ORIGINE GENOMICA DI NUOVI GENI miRNA

Come nascono nuovi geni miRNA nel genoma? Dal punto di vista della biogenesi, la prerogativa centrale di un gene miRNA è la corretta struttura secondaria del suo prodotto RNA, in modo tale che le forcine che verranno riconosciute e processate da *Drosha* e *Dicer* possano risultare funzionali nel processo di silenziamento genico. Di conseguenza, il requisito fondamentale per la nascita di un nuovo gene miRNA è un segmento genomico che una volta trascritto possa produrre un RNA *fold*, che sia riconosciuto dal macchinario del miRNA. Sono state proposte diverse ipotesi circa le origini genomiche di un nuovo gene miRNA (**Figura 2**).

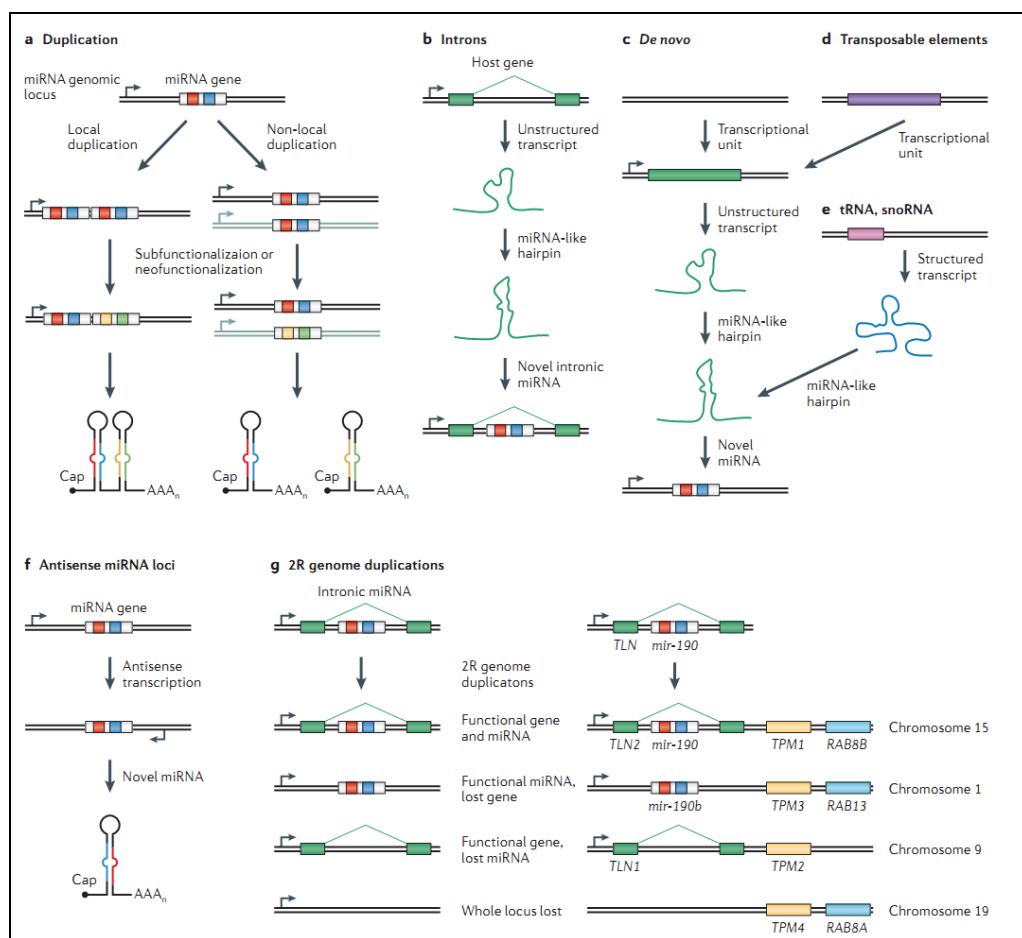


Figura 2. Origine genomica di nuovi geni miRNA. **a)** Nuovi geni miRNA possono nascere da duplicazioni locali o non locali di geni miRNA esistenti. Nella duplicazione locale, la nuova copia del gene è localizzata in prossimità dell'originale e due copie sono trascritte come un singolo trascritto primario. Nella duplicazione non locale, la nuova copia è lontana dall'originale e il suo trascritto è indipendente. Processi di sub- o neo-funzionalizzazione guidano l'evoluzione della duplicazione genica e possono eventualmente portare a cambiamenti di sequenza nelle regioni di miRNA maturo e miRNA* (indicate in rosso, giallo e verde) ed alla nascita di nuove sequenze miRNA. **b)** Le sequenze introniche sono una frequente fonte di trascritti non organizzati che possono gradualmente evolvere in nuovi miRNA intronici attraverso uno *stage* di forcina *miRNA-like*. **c)** La nascita dei miRNA *de novo* ha inizio da un'unità trascrizionale che è la prima a svilupparsi e che provvede inizialmente all'origine di un trascritto non strutturato, che attraversa uno *stage* sotto forma di forcina *miRNA-like* e si sviluppa in un nuovo gene miRNA. **d)** Elementi trasponibili possono fornire nuove unità trascrizionali per l'evoluzione di forcine *miRNA-like* in nuovi geni miRNA. **e)** Trascritti strutturali, come tRNA e *small nucleolar RNA* (snoRNA), possono evolversi in nuovi miRNA attraverso uno *stage* sotto forma di forcina *miRNA-like*. **f)** La trascrizione antisense di loci esistenti di miRNA può portare alla formazione di miRNA con nuove sequenze di miRNA maturo e miRNA* (blu e rosso, rispettivamente). **g)** Destini teorici dei miRNA intronici e dei loro geni ospiti dopo due *rounds* (2R) di duplicazione genomica. Dopo 2R di duplicazione genomica, l'intero locus può conservare entrambe le funzioni (gene e miRNA) oppure l'uno o l'altro, o l'intero locus può essere perso. Il locus del miR-190/TAL è un esempio di tutti e quattro i possibili risultati. RAB8B, *member RAS oncogene family*; TLN, *talín*; TPM1, *tropomyosina 1* (da Berezikov, NAT REV GENETICS 2011).

1.5 ORGANIZZAZIONE GENOMICA E STRUTTURA GENICA DEI miRNA

I miRNA sono presenti anche in semplici organismi multicellulari, come poriferi (spugne) e cnidari e sono filogeneticamente conservati in molti degli animali bilaterali; ~55% dei miRNA in *C. elegans* sono omologhi a quelli dell'uomo, questo indica che i miRNA hanno avuto un importante ruolo nell'evoluzione animale [13]. I miRNA presenti negli animali sembrano essersi evoluti separatamente da quelli presenti nelle piante, poiché le loro sequenze, i loro precursori e i loro meccanismi biogenetici sono distinti da quest'ultimi [14, 15]. Ad oggi sono stati identificati centinaia di miRNA umani, più di 1600 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. In questo *database*, che è accessibile *online* (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml>), sono presenti anche le informazioni che riguardano la genomica dei miRNA, ovvero il modo in cui i loro geni sono organizzati sui cromosomi umani. I geni *MIR* sono dispersi in tutti i cromosomi umani, fatta eccezione per il cromosoma Y; nel 50% dei casi, essendo organizzati in *cluster*, sono trascritti in un unico trascritto primario che viene successivamente processato ottenendo in questo modo le singole molecole di miRNA [16]. I miRNA in *clusters* sono spesso correlati funzionalmente. Per quanto riguarda la localizzazione genomica dei miRNA, come mostrato nella **Figura 3**, essi possono essere distinti in:

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

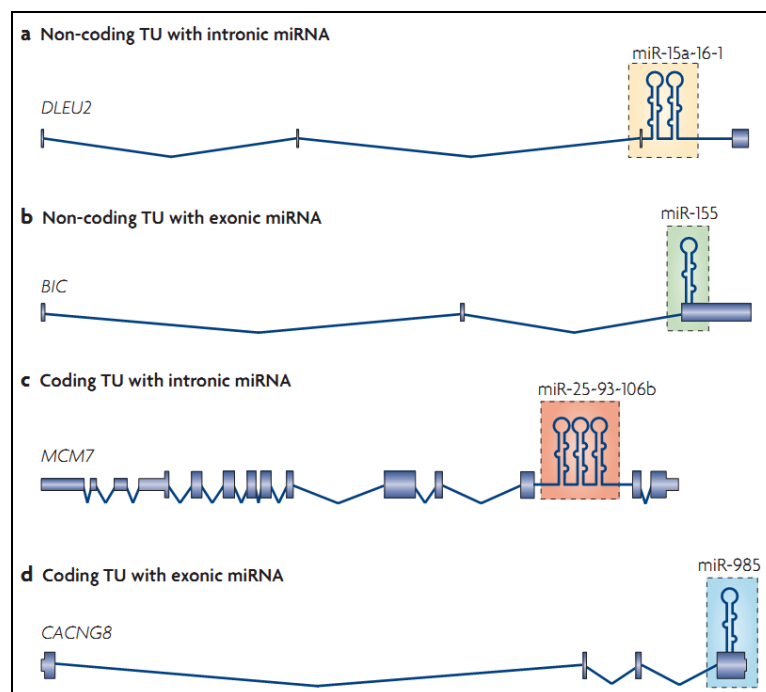


Figura 3. Localizzazione genomica e struttura genica dei miRNA. I miRNA possono essere distinti in quattro gruppi in base alla loro localizzazione genomica relativa alle posizioni esoniche ed introniche: **(a)** miRNA intronici in trascritti non codificanti, come il *cluster* miR-15-16-1; il *cluster* miR-15a~16-1 si trova nell'introne di un gene definito *non coding* RNA, DLEU2; **(b)** miRNA esonici localizzati in trascritti *non coding*; **(c)** miRNA intronici localizzati in trascritti codificanti proteine: un esempio è rappresentato dal *cluster* miR-25-93-106b, che è presente nell'introne del trascritto per il fattore della replicazione del DNA, MCM7; **(d)** miRNA esonici in trascritti codificanti proteine: un esempio è dato dal miR-985, localizzato nell'ultimo esone dell'mRNA CACNG8. I box blu indicano le regioni codificanti le proteine. TU, unità trascrizionali (da Kim, Nat Rev Molecular Cell Biology, 2009).

1.6 miRNA E GENI OSPITI

Ponendo una maggiore attenzione alla genomica dei miRNA, possiamo soffermarci su quelli localizzati all'interno di introni di geni codificanti proteine. La relazione tra i miRNA intragenici e i loro geni ospiti presenta molte questioni circa la loro organizzazione genomica, regolazione trascrizionale, processamento, funzione [17]. L'organizzazione genomica dei miRNA intragenici mostra una forte influenza direzionale, quando il miRNA e il gene ospite hanno lo stesso orientamento. Le analisi *microarray* supportano l'ipotesi che i miRNA intronici sono usualmente espressi in coordinazione con l'mRNA del gene ospite nei tessuti umani [18, 19], suggerendo che la co-

trascrizione dallo stesso promotore è il più comune meccanismo trascrizionale in condizioni normali. Inoltre, nel caso dei miRNA intronici, i primi *steps* nella biogenesi dei miRNA sono complicati dalla richiesta del macchinario per il corretto *splicing* del pre-miRNA e l'assemblaggio dell'mRNA ospite maturo. Recenti lavori bioinformatici e sperimentali hanno dimostrato che i miRNA intronici possono essere processati co-trascrizionalmente [20] prima dello *splicing*, come mostrato in **Figura 4** [21].

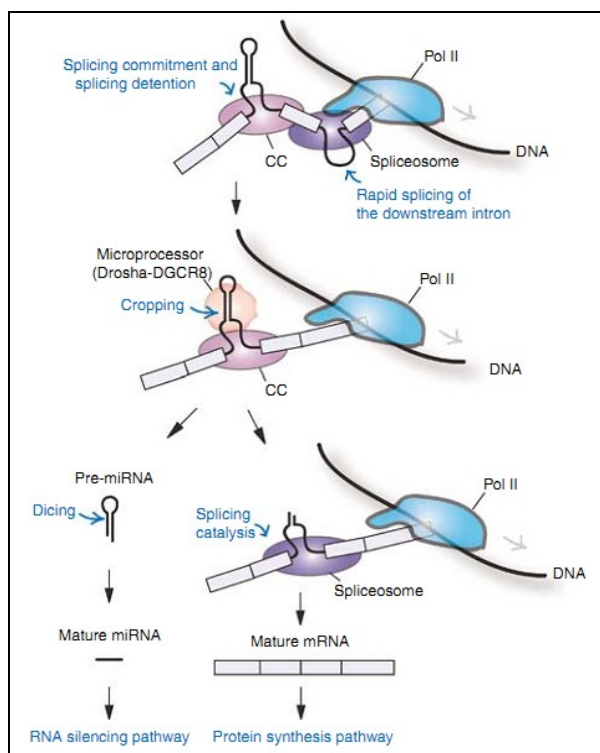


Figura 4. Un modello per il processamento dei miRNA intronici. Gli esoni fiancheggianti il miRNA sono cotrascrizionalmente definiti e fisiologicamente avvicinati tra loro da un complesso impegnato nello *splicing*. Gli introni *downstream* subiscono lo *splicing* rapidamente, mentre quello del miRNA nell'introne ospitante è tardivo. Il Microprocessore taglia l'introne che rilascia il pre-miRNA, il quale è successivamente processato da Dicer. Poiché gli esoni erano stati già legati fra di loro, la catalisi dello *splicing* dovrebbe avvenire efficientemente nonostante la discontinuità dell'introne (da Kim, The EMBO Journal 2007).

Recenti lavori suggeriscono che parecchi miRNA intragenici subiscono una regolazione post-trascrizionale [22]: difetti in questo processo sono stati associati con lo sviluppo di tumori [23-26].

1.7 BIOGENESI DEI miRNA

Affinché i miRNA possano svolgere la loro funzione è necessario che subiscano un processo di maturazione, un meccanismo altamente compartimentalizzato che inizia a livello nucleare per poi concludersi nel citoplasma (**Figura 5**). La trascrizione dei geni per i miRNA è mediata prevalentemente dalla RNA Polimerasi II (Pol II) [27, 28], sebbene esistano casi di trascrizione da parte della RNA polimerasi III (Pol III)) [29]: 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.

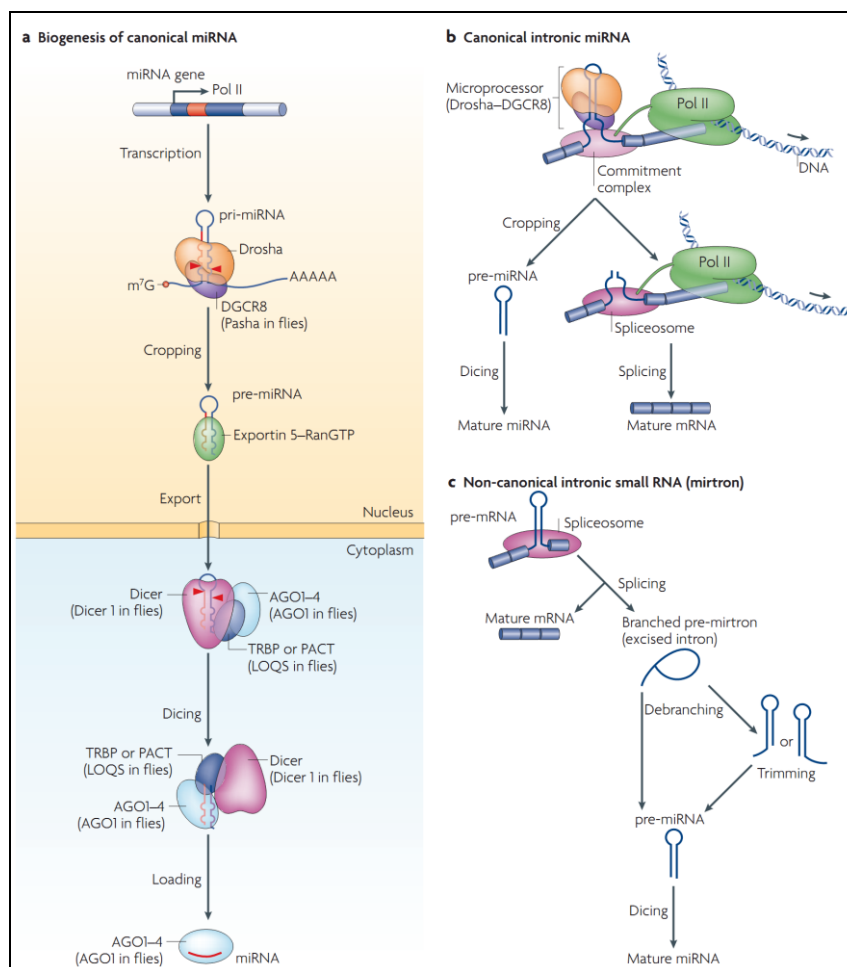


Figura 5. Biogenesi della pathway dei miRNA. **a)** I geni miRNA nella biogenesi canonica sono trascritti dall'RNA Polimerase II (Pol II) per generare i trascritti primari (*pri-miRNAs*). Lo step iniziale (*cropping*) è mediato dal complesso *Drosha-DiGeorge syndrome critical region gene 8* (DGCR8; Pasha in *D. melanogaster* and *C. elegans*) anche conosciuto come complesso del Microprocessore, che genera un pre-miRNA di ~65 nucleotidi (nt). Il pre-miRNA ha un piccolo stelo più un'estroflessione di ~2-nt al 3', che è riconosciuto dal *nuclear export factor exportin 5* (EXP5). Nel trasporto dal nucleo, l'RNasi citoplasmatica III Dicer catalizza il secondo step di processamento per produrre il miRNA duplex. Dicer, TRBP (*TAR RNA-binding protein*; also known as TARBP2) e le proteine Argonaute (AGO) 1-4 mediano il processamento del pre-miRNA e l'assemblaggio del RISC nell'uomo. Uno *strand* del duplex rimane nelle proteine Ago come miRNA maturo, mentre l'altro *strand* è degradato. Si ritiene che Ago sia associato a Dicer nello step *Dicing* sia in quello dell'assemblaggio del RISC. **b)** I miRNA intronici nella biogenesi canonica sono processati co-trascrizionalmente prima dello *splicing*. Gli introni contenenti i miRNA subiscono lo *splicing* più lentamente degli introni adiacenti per ragioni non conosciute. Si pensa che il complesso dello *Splicing* legghi gli introni mentre Drosha clivi la forcina del miRNA. Il pre-miRNA entra nella *pathway* dell'miRNA, mentre il resto del trascritto subisce lo *splicing* del pre-mRNA e produce l'mRNA maturo per la sintesi di una proteina. **c)** I miRNA intronici non canonici sono prodotti dallo *splicing* intronico e dal *debranching*. Poiché alcuni piccoli RNA (chiamati *mirtrons*) possono derivare da piccoli introni, che assomigliano ai pre-miRNA, possono anche non subire il processamento da parte di Drosha. Alcuni introni hanno estremità sia al 5' che al 3', cosicché necessitano di essere tagliate prima che il pre-miRNA venga esportato. m7G, 7-methylguanosina (da Kim, Nat Rev Molecular cell Biology 2009).

Successivamente, il pri-miRNA viene processato da una RNase III nucleare ad attività endonucleasica (Drosha, una proteina di circa 160kDa), che agendo in cooperazione con il cofattore DGCR8 (*Di George syndrome critical region gene 8*), si lega alla struttura a *stem-loop* ed effettua dei tagli in siti specifici che determinano il rilascio del pre-miRNA. Questa fase specificatamente nucleare prende il nome di *cropping*. Il pre-miRNA, lungo circa 60-80 nucleotidi, possiede uno *stem* a doppio filamento di circa 33 nucleotidi complementari tra loro ed un *loop*, ed è caratterizzato da 2-3 nucleotidi sporgenti al 3' ed un gruppo fosfato al 5' [30, 31]. 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 (Figura 6) [32].

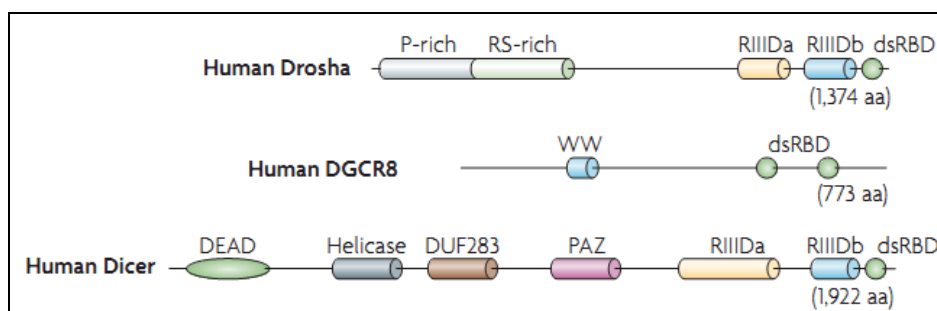


Figura 6. Proteine RNasi III e loro meccanismo d'azione. Negli animali sono presenti due tipi di RNasi: Drosha e Dicer. Entrambe le proteine possiedono degli specifici domini catalitici RNasi di tipo III (RIIIDa, RRIIDb) conservati, che agiscono generando delle estremità 3' sporgenti di 2 nucleotidi (da Kim, Nat Rev Mol Cell Biology 2009).

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 di dimensioni variabili tra 21 e 25 nucleotidi, contenente sia il filamento maturo del miRNA che il suo filamento complementare (con appaiamenti imperfetti) [33, 34]. Nei mammiferi, 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 un'antica famiglia, le proteine Argonauto, 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 7**).

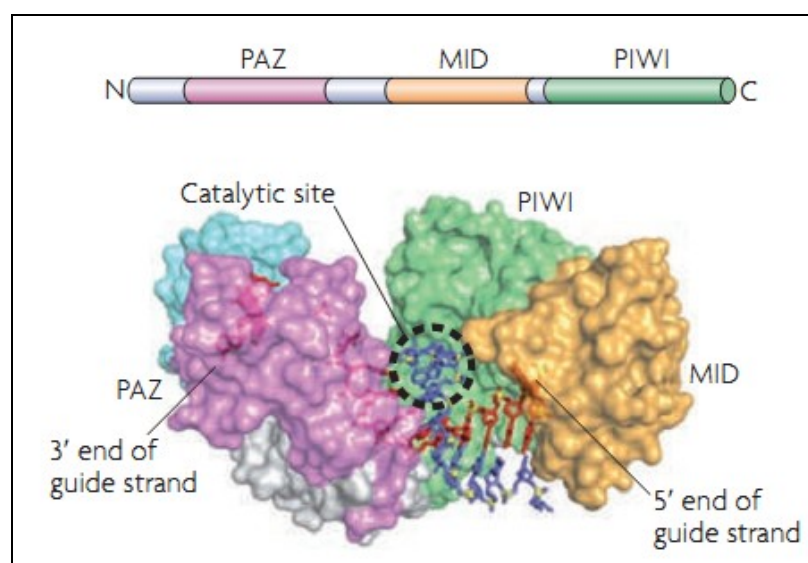


Figura 7. Domini conservati e struttura delle proteine della famiglia delle Argonauto (da Kim, Nat Rev Molecular cell Biology 2009).

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 identificato in uno o nell'altro filamento, esso si origina quasi sempre dal filamento che presenta l'estremità 5' più instabile, mentre l'altro filamento verrà degradato [35]. 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 (**Figura 8**) [36].

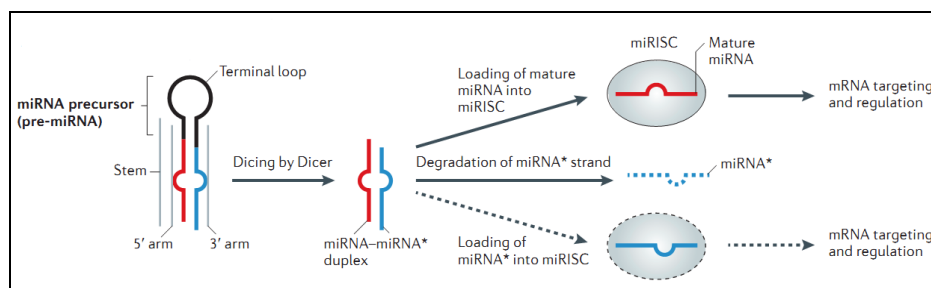


Figura 8. Selezione del filamento che costituirà il miRNA maturo (da Berezikov, NAT REV GENETICS 2011).

Un meccanismo a parte è 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. L'RNA che si genera forma una struttura a forcina che viene esportata nel citoplasma dall'Esportina 5 e tagliata direttamente dal Dicer (**Figura 5 c**) [37].

1.8 REGOLAZIONE POST-TRASCRIZIONALE MEDIATA DAI miRNA

Al fine di portare a termine la sua funzione di regolatore negativo post-trascrizionale, il miRNA maturo sarà legato dalla proteina Argonata (Ago-2) e quindi convogliato verso il complesso RISC, al quale si legherà. Il complesso RISC rappresenta il vero e proprio effettore della repressione miRNA-mediata. Esso è costituito da alcune fondamentali proteine della famiglia Argonata (Ago1-Ago4) e da altre che regolano la funzione inibitoria degli effettori del complesso stesso. In particolare, il miRNA maturo riconoscerà e legherà il suo specifico mRNA *target*, la cui espressione sarà repressa (naturalmente sulla base delle leggi della complementarietà). Negli animali, e quindi nell'uomo, questo tipo di riconoscimento è mediato dalla regione 3'UTR del trascritto *target* che può contenere siti multipli di legame al miRNA, in cui sono presenti

delle regioni di 2-8 nucleotidi, definite *seed*, essenziali per l'appaiamento [38], che tuttavia non è sempre perfetto ma caratterizzato da *mismatches* e da *bulges*. In alcuni rari casi, le regioni *target* dei segmenti *seed* sono state localizzate nelle molecole di mRNA anche a livello della regione 5'UTR o in regioni codificanti. Il complesso RISC potrà così inibire l'espressione dell'mRNA selezionato attraverso due differenti modalità principali:

- ✓ Ago-mediata dell'mRNA, nel caso di perfetta complementarità tra il *target* ed il messaggero maturo [38]. In tal caso la degradazione è dovuta all'instabilità del messaggero, determinata dalla sua deadenilazione e dal suo *decapping*. Questi effetti sono mediati, oltre che dalle proteine Argonata, dalla proteina GW182 e dal macchinario cellulare del *decapping* e della deadenilazione. La degradazione avverrebbe nei cosiddetti *p-bodies* (*processing Bodies*), in cui si accumulerebbero ingenti quantità di mRNA non tradotti, proteine Argonata, miRNA maturi e repressori trascrizionali [39- 41].
- ✓ Inibizione della traduzione dell'mRNA, in presenza di *mismatch* in posizione centrale tra il *target* ed il maturo [38]. Tale meccanismo potrebbe essere messo in atto nelle fasi di inizio e di allungamento della traduzione, oltre che durante la terminazione, o addirittura si compierebbe con la degradazione del polipeptide appena formato. Un modello recente ipotizza che il complesso RISC possa agire prevenendo l'associazione tra le subunità ribosomiali 40S e 60S, come mostrato nella **Figura 9** [38, 42].

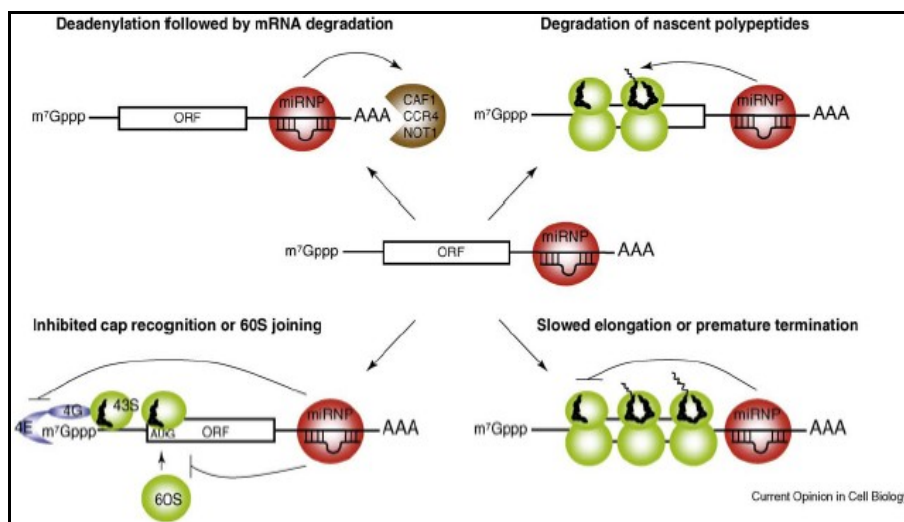


Figura 9. Rappresentazione grafica, di alcuni dei possibili meccanismi d'azione del complesso RISC indotto dai miRNA. Il messaggero *target* può essere deadenilato e degradato, oppure può essere inibita la sua traduzione, in diversi modi qui rappresentati (da Chekulaeva, Current Opinion in Cell Biology 2009).

1.9 GENI *TARGET* DEI miRNA

Da un punto di vista funzionale è molto complesso studiare la funzione dei miRNA. A ogni modo, considerando che i miRNA regolano negativamente l'espressione dei loro geni *target*, risulta chiaro che le funzioni dei miRNA dipendano essenzialmente da quelle dei loro *targets*; infatti, sia questi ultimi che i miRNA partecipano alla regolazione dei medesimi processi biologici, ma con effetti chiaramente opposti. Pertanto la ricerca dei *targets* dei miRNA è di fondamentale importanza per i più recenti studi funzionali. Gli approcci utilizzati a tale scopo sono quello bioinformatico e quello sperimentale, sicuramente più diretto. Pertanto sono stati implementati diversi algoritmi, capaci di effettuare l'allineamento tra la sequenza del maturo di un dato microRNA e quella del genoma in questione. Così, sulla base di una complementarità più o meno perfetta (visto il meccanismo d'azione dei miRNA), è possibile predire i possibili siti di legame all'interno dei 3'UTR di specifici *targets* [43]. Tuttavia le garanzie offerte da questo approccio non sono assolute, dal momento che esso si basa su predizioni. Peraltro, esistono

numerosi algoritmi in grado di fare queste predizioni, ed ognuno di questi utilizza dei parametri di ricerca leggermente differenti. Tra i *tools* più utilizzati al momento possiamo elencare TargetScan, Pictar-Vert e miRANDA. Al contrario, l'approccio sperimentale si basa su diverse tipologie di esperimenti, che variano in base alle metodologie adottate. Così negli ultimi anni il numero di *targets* identificati computazionalmente e poi validati sperimentalmente è aumentato sempre di più, fino a circa 600 *targets*. Tra le tecnologie più utilizzate a tale scopo, sicuramente il test della luciferasi offre un valido supporto metodologico. In particolare, negli ultimi anni, è stato osservato che molti *targets* di miRNA umani sono costituiti da mRNA di geni codificanti per alcuni fattori della trascrizione, confermando l'importanza dei miRNA nell'ambito delle *networks* regolatrici.

1.10 REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA DEI miRNA

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 in modo simile a quello di molti geni di seconda classe: infatti, a livello dei promotori di diversi geni miRNA sono presenti gli stessi elementi regolativi (TATA box *sequences*, CpG *Islands*,

inization elements) dei promotori per i geni codificanti proteine (**Figura 10**). Ad esempio, i fattori di trascrizione (TF) rappresentano un'importante classe di proteine cellulari coinvolte nel controllo dell'espressione genica, essenziale nella maggior parte dei processi biologici. In particolare, tali proteine hanno la capacità di legare specifiche regioni di DNA nel genoma (i siti di legame per i fattori della trascrizione, TFBS), e quindi controllare la trascrizione del DNA. In genere i TF possono agire da soli oppure far parte di grandi complessi regolatori, promuovendo o bloccando il reclutamento della RNA polimerasi II, essenziale per la trascrizione di specifici geni. Nel caso di attivazione della trascrizione si parla di attivatori, mentre in quello di inattivazione si parla di repressori trascrizionali (**Figura 10a**: gli attivatori trascrizionali e i repressori sono mostrati in verde e rosso, rispettivamente).

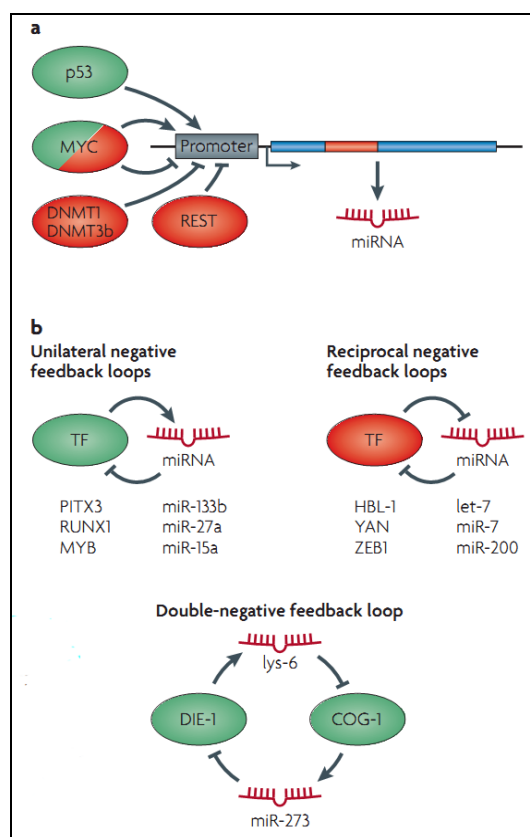


Figura 10. a) Attivatori e repressori della trascrizione dei miRNA; **b)** Regolatori delle *networks* dell'espressione dei miRNA (Da Krol, NATURE REVIEWS Genetics 2010).

Molti fattori di trascrizione (TF) regolano l'espressione tessuto-specifica o stadio di sviluppo-specifica (ad esempio, MYC/MYCN che stimolano l'espressione del *cluster* oncogenico miR-17-92 in cellule di linfoma [44], o REST che inibisce l'espressione del miR-124 in cellule non neuronali o progenitori neuronali tramite deacetilazione istonica e metilazione del promotore [45]. Inoltre, i miRNA frequentemente agiscono in *networks* regolatorie insieme con i TF, i quali possono guidare o reprimere l'espressione dei miRNA. 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 (**Figura 10b**). La regolazione del processamento dei miRNA avviene a livello di Drosha, di Dicer e delle loro proteine accessorie. Ad esempio è stato visto che alcune elicasi nel topo (p68 e p72) e le proteine SMAD (trasduttori dei segnali della via del TGF- β e BMP) agiscono a livello di Drosha, controllando così la produzione del pri-miR [46]. Invece, al livello del pre-miR è stato visto 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 Dicer, portando a un generale aumento di tutti i pre-miR [47]. L'*editing* del pri-miR o del pre-miR da parte delle proteine ADAR (*adenosine deaminase*) (che catalizzano la conversione dell'adenosina in inosina) altera la sua struttura secondaria e quindi la stabilità, mentre l'*editing* nel *seed* del miRNA maturo da parte di altre proteine altererebbe il riconoscimento del *target* [48]. 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, il preciso controllo del *decay* potrebbe avere un ruolo fondamentale nei meccanismi di sviluppo e di risposta di tipo *switch on-off* [48].

1.11 CORRELAZIONE TRA L'ESPRESSIONE DEI miRNA ED I GENI DI SECONDA CLASSE

Negli ultimi anni è stato sviluppato un nuovo approccio nello studio delle relazioni intercorrenti tra i miRNA ed i loro *targets*, i geni di seconda classe. In particolare, tale approccio si fonda sull'ipotesi che, se esiste una correlazione statisticamente significativa tra l'espressione di un particolare miRNA ed uno specifico gene, il gene in questione possa effettivamente essere controllato dal miRNA; ciò permetterebbe la predizione dei *targets*. È chiaro che in questo caso, la correlazione deve essere negativa, dato il ruolo repressivo sull'espressione genica svolto dai miRNA. Ulteriori analisi computazionali, atte a predire i possibili siti di legame per i miRNA nei 3'UTR di tali geni, hanno confermato in diversi casi questa ipotesi [49]. Un approccio simile è stato utilizzato anche per studiare la correlazione tra i miRNA intronici ed i loro geni ospiti: in questo caso è stata spesso osservata una correlazione positiva, indicando che presumibilmente in molti casi i miRNA intronici ed i loro geni ospiti siano controllati dal medesimo promotore [18]. Inoltre, generalmente l'orientamento dell'mRNA e del suo pre-miRNA è uguale, indicando che quest'ultimo possa essere trascritto insieme al gene ospite sotto il controllo del medesimo promotore, per poi essere processato. Del resto se non fosse così, al momento della loro contemporanea, ma indipendente, trascrizione si potrebbe creare un ingombro sterico tra le due RNA polimerasi in azione [18], rendendo inoltre difficoltoso l'assemblaggio delle numerose altre proteine coinvolte nella trascrizione e quindi nella sua prosecuzione. Inoltre, è stato osservato che il livello di correlazione tra l'espressione tra diversi miRNA localizzati sullo stesso cromosoma e con lo stesso orientamento (quindi potenzialmente in *cluster*) è inversamente proporzionale rispetto alla loro distanza genomica [49]. Questo tipo di risultato è stato riscontrato anche in altri studi su specifici *clusters*, i cui miRNA maturi potrebbero derivare dallo stesso trascritto primario. In particolare, considerando geni per miRNA distanti tra i 100 nucleotidi e le 100 Mb, si è visto che generalmente miRNA correlati

positivamente e con distanze minori di 50 Kb, potrebbero possedere lo stesso trascritto primario, e ciò dipenderebbe dal controllo co-regolativo e selettivo di elementi prossimali rispetto al *cluster* [18]. Questi dati consentono di considerare l'approccio correlativo un importante strumento nello studio delle relazioni intercorrenti tra i microRNA, i loro *target*, gli ospiti, e quindi per individuare i *clusters*.

1.12 miRNA: RUOLO FISILOGICO E PATOLOGICO

Negli Invertebrati i miRNA svolgono importanti funzioni nel controllo dello sviluppo embrionale, nella risposta a particolari condizioni di stress ambientale, nel differenziamento neuronale e nel controllo della crescita e della morte cellulare [1, 2]. E' ragionevole pensare che essi siano coinvolti in importanti processi fisiologici anche nei Vertebrati. Diversi studi sono a favore dell'ipotesi che alcuni miRNA possano essere necessari per il corretto sviluppo di organi e tessuti: si pensi, ad esempio, allo sviluppo cerebrale, all'ematopoiesi ed alla miogenesi [50]. Se fosse vero che questi piccoli *non-coding RNAs* sono fondamentali durante lo sviluppo dell'organismo e nel mantenimento dell'omeostasi, è lecito pensare che una loro mancata regolazione potrebbe comportare diverse patologie, come quelle di tipo immune, neurodegenerativo o neoplastico [1, 2].

1.12.1 CAUSE E CONSEGUENZE DELLA ALTERATA ESPRESSIONE DEI miRNA NEI TUMORI

Il fatto che i primi miRNA identificati in *C.elegans* e *D.melanogaster* fossero coinvolti nel controllo della proliferazione cellulare e nell'apoptosi e che molti dei primi miRNA umani ad essere identificati fossero localizzati prevalentemente in regioni cromosomiche, sottoposte a diversi tipi di riarrangiamento in specifici tipi di cancro umano, lascia pensare che i miRNA possano essere implicati nei processi neoplastici [51]. Un significativo numero

di geni 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-points*, fornendo un'ulteriore evidenza del loro ruolo nella patogenesi del cancro [51, 52]. A seconda del tipo di funzione biologica del miRNA, determinata dalle proteine che regola, si possono distinguere miRNA oncosoppressori e miRNA oncogeni (oncomiR) **Figura 11** [53].

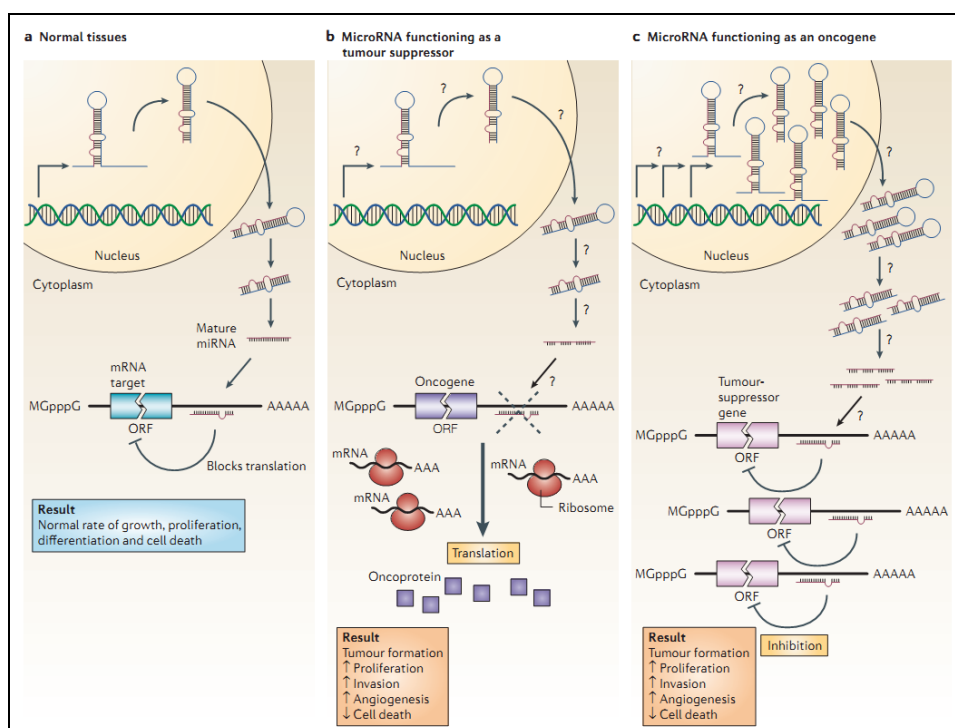


Figura 11. I miRNA come oncogeni ed oncosoppressori. **a)** In normali tessuti, la corretta trascrizione del miRNA, il processamento e il legame a sequenze complementari nel mRNA target determina la repressione dell'espressione genica del target attraverso un blocco nella traduzione della proteina. Il risultato complessivo è il normale ritmo di crescita cellulare, proliferazione, differenziazione e morte cellulare. **b)** La riduzione o la delezione di un miRNA che funziona come oncosoppressore porta alla formazione di tumore. Una riduzione o eliminazione dei livelli di miRNA maturo può verificarsi a causa di difetti in una delle fasi della biogenesi ed in ultimo porta ad una inappropriata espressione di miRNA-target oncoproteine. Il complessivo risultato potrebbe coinvolgere in una aumentata proliferazione, invasività o angiogenesi, diminuzione del livello di apoptosi o de-differenziamento tissutale portando in ultimo alla formazione di tumore. **c)** L'amplificazione o la sovra espressione di un miRNA che ha un ruolo oncogenico comporterebbe la formazione del tumore. In questa situazione, un aumento nel livello di un miRNA, che potrebbe essere prodotto in maniera inappropriata o in tessuto errato, inibirebbe l'espressione di un miRNA-target oncosoppressore e porterebbe alla progressione del tumore (da Esquela-Kerscher, NATURE REVIEWS | CANCER 2006).

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 sei geni miRNA sovraespressi in tumori solidi e nel linfoma diffuso a larghe cellule B. Tra i miRNA oncosoppressori 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 1).

Tabella 1. miRNA che funzionano come oncogeni ed oncosoppressori nei tumori umani.

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 DNMTs	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

AML, acute myeloid leukaemia; BCL2, B cell leukaemia/lymphoma 2; BIM, Bcl2-interacting mediator of cell death; CLL, chronic lymphocytic leukaemia; DNMT, DNA methyltransferase; HMGA2, high mobility group AT-hook 2; LATS2, large tumour suppressor homologue 2; MCL1, myeloid cell leukaemia sequence 1; MDS, myelodysplastic syndrome; PDCD4, programmed cell death 4; PTEN, phosphatase and tensin homologue; SHIP1, SH2 domain-containing inositol-5'-phosphatase 1; TCL1, T cell lymphoma breakpoint 1; TIMP3, tissue inhibitor of metalloproteinases 3; TPM1, tropomyosin 1; WT1, Wilms tumour 1.

Sulla base delle caratteristiche sopra descritte, i miRNA possono essere considerati *targets* appropriati per la terapia anti-tumorale. Infatti, l'introduzione dei miRNA o degli antimiR nei tumori, in cui fossero stati deleti, potrebbe avere come conseguenza la normalizzazione del fenotipo molecolare [54, 55]. L'introduzione di queste molecole e la loro espressione può avvenire tramite vettori adenovirali, retrovirali o tramite la coniugazione di oligonucleotidi con molecole lipofile. Inoltre, per i tumori in cui si assiste a

un silenziamento epigenetico di geni onco-soppressori si potrebbe ipotizzare una terapia basata sull'introduzione di miRNA che controllano le *DNMTs* (*Dna Methyl-Transferases*), come i membri della famiglia del miR-29 [56]. E' quindi facile immaginare che alcuni miRNA potrebbero essere considerati dei biomarcatori ottimali, utili nella stratificazione dei pazienti sia in fase diagnostica che prognostica.

1.13 PROTEOGLICANI E CHPF2: RUOLO FISIOLOGICO E PATOLOGICO

I proteoglicani (PG) sono localizzati sulla superficie delle cellule a livello della matrice extracellulare; i PG risultano distribuiti in un vasto *range* di cellule e tessuti, principalmente cellule dell'epidermide, cellule muscolari, cellule endoteliali e nervose. Essi rivestono un ruolo particolarmente importante nella formazione ed organizzazione della matrice extra-cellulare, oltre ad essere coinvolti negli eventi di *signaling*, adesione e crescita cellulare. In particolare, si è osservato che alterazioni nella sintesi, (incremento o decremento dei proteoglicani o alterazioni agli enzimi, che intervengono nella loro biosintesi), possono compromettere sensibilmente la funzionalità di alcuni organi [57].

La biosintesi dei proteoglicani ha inizio con l'aggiunta di Xilulosio ad uno specifico residuo di serina del *core* proteico, seguito dall'aggiunta di due residui di galattosio ed uno di acido glucuronico con la formazione della struttura tetrasaccaridica; nel caso in cui il proteoglicano in questione sia il condroitinsolfato, la restante catena di glicosamminoglicani è costituita da un'unità disaccaridica costituita da acido D-glucuronico ed N-acetil-glucosammina come mostra la **Figura 12** [58].

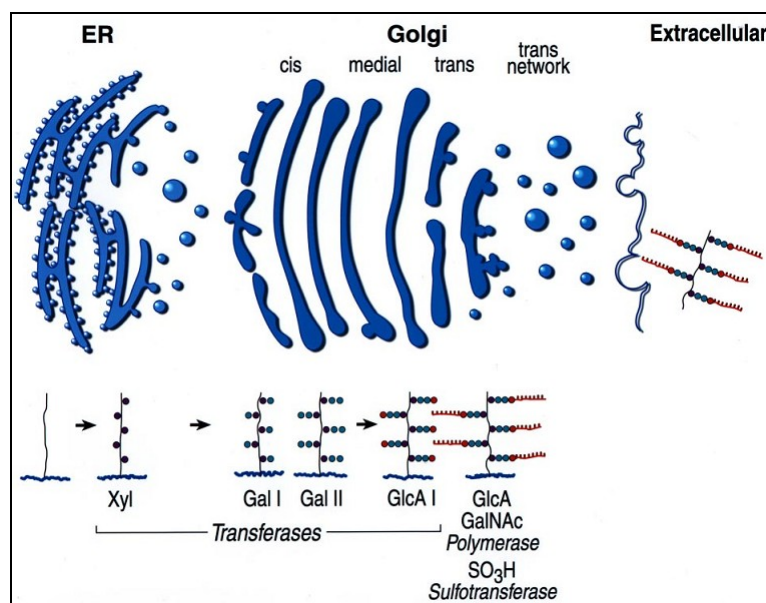


Figura 12. Sintesi dei proteoglicani e localizzazione a livello dell'apparato di Golgi delle trasferasi (da Silbert, IUBMB Life 2002).

Dopo la sintesi, i PG vengono trasportati dal Golgi alle loro destinazioni: la matrice extracellulare (ECM), la superficie della cellula o gli organuli intracellulari. Tale trasporto vettoriale richiede un meccanismo di riconoscimento, ordinamento e consegna, meccanismi importanti tanto nelle cellule epiteliali quanto nei neuroni, dove la membrana cellulare comprende domini separati. Riconoscimento e ordinamento richiedono obbligatoriamente determinanti nelle catene di GAG e/o dei *core* proteici dei proteoglicani. Dopo il raggiungimento della membrana plasmatica, i PG possono divenire parte del legame e comprendere molecole di segnalazione come fattori di crescita o andare a costituire l'interferone- γ . La carica negativa dei PG è impegnata nel legame di piccole molecole di carica positiva, come l'istamina o le proteasi [59, 60]. È stato evidenziato che a livello del Sistema Nervoso Centrale (SNC) i proteoglicani sono coinvolti nella sinaptogenesi e nello sviluppo dello stesso, ma sono anche implicati in disturbi neurologici. In particolar modo è stato dimostrato che i proteoglicani condroitinsolfato risultano avere un effetto negativo sulla plasticità neuronale a seguito di lesioni o traumi al SNC, essendo responsabili dell'insuccesso della rigenerazione assonale: infatti, insieme ad

altre molecole aumentano sensibilmente a livello della regione della lesione, inibendo la rigenerazione degli assoni. L'iniezione di una *chondroitinase ABC*, a livello della regione danneggiata, o la soppressione degli enzimi coinvolti nella sintesi di questo proteoglicano hanno determinato una promozione del fenomeno rigenerativo nei siti danneggiati ed un ripristino della funzionalità sinaptica [60-62].

Il gene *CHPF2* (*CSGLCA-T*) codifica la *Chondroitin Sulfate Glucuronyltransferase*, che è un enzima contenente una regione N-terminale tipica delle proteine transmembrana di 2° classe. La proteina *CHPF2* è costituita da 772 amminoacidi e mostra un'attività catalitica trasferasica, che svolge a livello della *medial/trans* membrana dell'apparato di Golgi (**Figura 11**). La proteina possiede un dominio contenente 3 motivi glicosiltransferasici e presenta un dominio β 3-glucuroniltransferasico ma non un dominio β 4-glucuroniltransferasico, sebbene entrambi sono stati trovati nella *condroitin sintetase* (*CSS3*) (**Figura 13**).

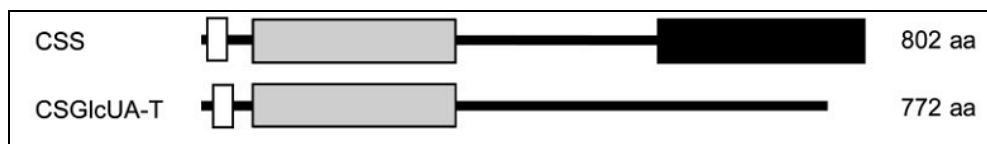


Figura 13. Domini β 3-glucuroniltransferasici mostrati in grigio e β 4-glucuroniltransferasici mostrati in nero (da Gotoh, *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 2002).

Dall'analisi delle sequenze genomiche si è potuto evidenziare che il gene in questione è localizzato sul cromosoma 7 ed è costituito da quattro esoni. Il dominio catalitico dell'enzima è stato caratterizzato ed espresso in cellule *COS-7*: l'attività glucuroniltrasferasica è stata osservata in presenza di polisaccaridi condritin- e condroitinsolfato ed oligosaccaridi come substrato. Quest'enzima è effettivamente coinvolto nella biosintesi del condroitinsolfato

ed è responsabile dell'assemblaggio selettivo della catena di condroitinsolfato; la sua funzione principale è quella di trasferire gruppi di acido glucuronico alla catena di glicosamminoglicani (GAGs) nascenti [63, 64]. Recentemente è stato dimostrato che la sintesi del condroitinsolfato è frutto della combinazione di diversi membri enzimatici *ChSy-1* (*condroitin sintetasi*), *ChSy-2* (*CSS3*) (*condroitin solfato sintetasi*), *ChPF*, il fattore di polimerizzazione del condroitinsolfato, e di un altro membro, chiamato *condroitin solfato glucuronil trasferase ChSy-3* (*CHPF2*); *CHPF2*, il cui ruolo di è ancora incerto, possiede soltanto attività di allungamento della catena del condroitin solfato, non di sintesi. Analisi effettuate tramite *Quantitative Real Time PCR* (QPCR) indicano una elevata espressione di quest'enzima a livello della placenta, intestino, e pancreas, anche se risulta comunque ubiquitariamente espresso [63].

1.14 IL GLIOBLASTOMA MULTIFORME (GBM)

1.14.1 CLASSIFICAZIONE DEI GLIOMI

Circa il 70% di tutti i tumori che colpiscono il SNC è rappresentato dai gliomi, [65, 66], un gruppo di tumori cerebrali che si originano a partire da cellule della linea gliale, cellule che notoriamente oltre fornire supporto meccanico alle cellule neuronali in termini di nutrienti, ossigeno e smaltimento di prodotti di scarto, intervengono anche in tutti quei meccanismi di trasduzione del segnale e comunicazione con le stesse cellule neuronali a cui forniscono sostegno. Il precursore cellulare che conduce alla formazione dei gliomi è ancora sconosciuto (**Figura 14**). Una delle principali teorie afferma che le cellule staminali neurali o i progenitori neurali subiscano una tipica trasformazione neoplastica durante lo sviluppo, più precisamente quando esse attraversano una fase di proliferazione transitoria. Un'altra evidenza punta invece alla de-differenziazione, indotta da mutazione, delle cellule mature, quali oligodendrociti e astrociti [67].

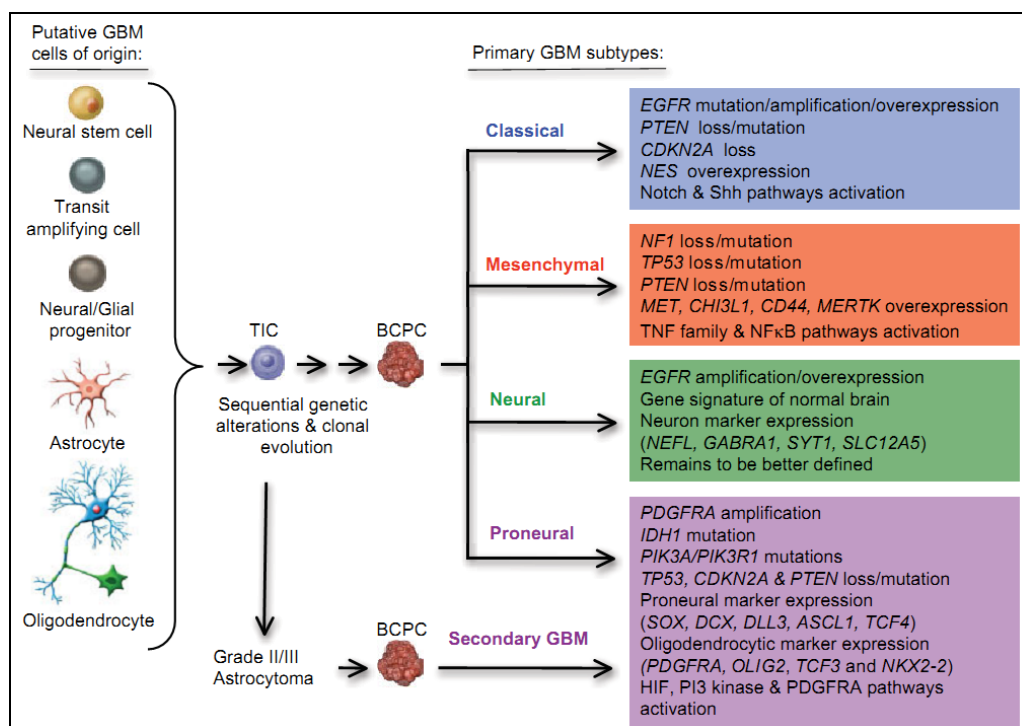


Figura 14. Cambiamenti genetici sequenziali osservati nella patogenesi del glioblastoma. Alcune cellule presenti nel normale tessuto cerebrale potrebbero andare incontro ad alterazioni genetiche che conducono alla nascita di una popolazione di cellule iniziatrici del tumore (TIC). Queste possono ulteriormente accumulare alterazioni genetiche ed epigenetiche e divenire una popolazione di cellule propagatrici del tumore (BCPC). Le cellule BCPC sono responsabili della formazione del glioma (da Olson, *CA Cancer J Clin* 2010).

I gliomi sono classificati da un punto di vista istologico ed immunoistochimico in astrocitomi, oligodendrogliomi ed in tumori con caratteristiche morfologiche sia astrocitiche che oligodendrocitiche, detti oligoastrocitomi. Questi tumori sono poi suddivisi dal grado I al grado IV in accordo con il loro *degree* di malignità ed alterazioni genetiche (**Figura 15**), accompagnati da grandezza delle cellule, grado di pleiomorfismo cellulare, attività mitotica, grado di proliferazione e necrosi dei periciti e dell'endotelio microvascolare [68].

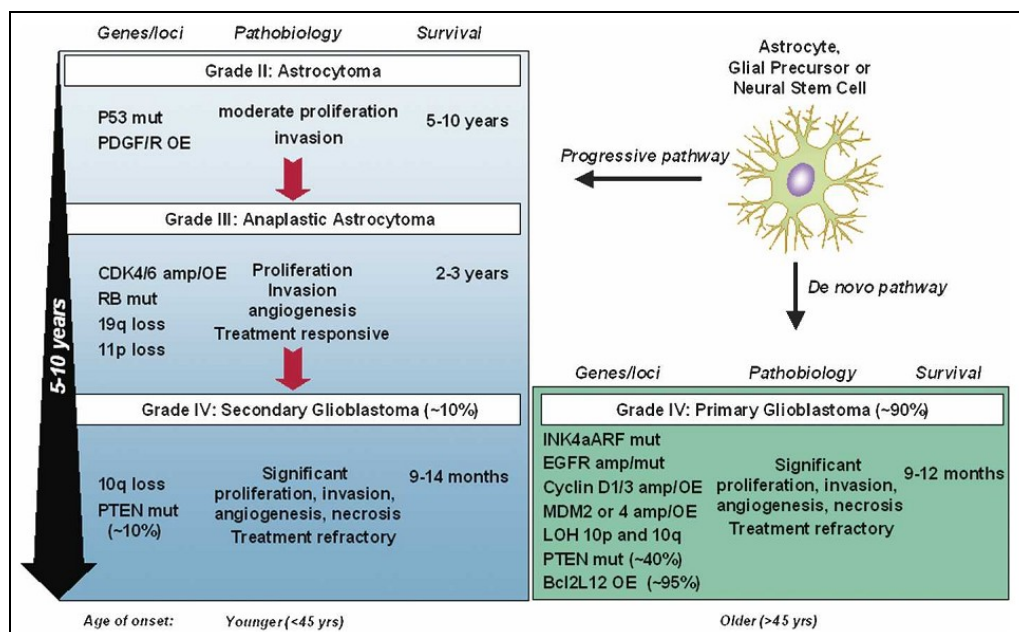


Figura 15. Aberrazioni cromosomali e genetiche coinvolte nella genesi del glioblastoma. Sono mostrate le relazioni tra le aberrazioni genetiche, la patobiologia e la sopravvivenza che conducono alla formazione del glioblastoma primario e secondario (da Furnari. *Genes Dev.* 2007).

I tumori di grado I sono biologicamente benigni e possono essere curati se rimossi in tempo mediante intervento chirurgico. I tumori di grado II sono tumori a basso grado di malignità e hanno potenzialmente un lungo decorso clinico; sono però caratterizzati da un precoce e diffuso evento di infiltrazione nel tessuto cerebrale circostante e ciò li rende incurabili attraverso l'intervento chirurgico. I tumori di grado III mostrano una maggiore anaplasia e proliferazione rispetto ai tumori di grado II e conducono il paziente a morte più rapidamente. I tumori di grado IV sono caratterizzati dal più alto grado di malignità e prevedono eventi di proliferazione vascolare e necrosi. Il tumore di grado IV prende anche il nome di glioblastoma multiforme (GBM) o, più semplicemente, glioblastoma [66, 67].

1.14.2 PATOLOGIA E CARATTERISTICHE CLINICHE DEI GLIOMI

Il glioblastoma multiforme è il più comune e aggressivo tipo di tumore gliale, poiché presenta particolare tendenza all'invasività e alla proliferazione cellulare; l'incidenza è di 2-3 nuovi casi all'anno su 100.000 abitanti. La sopravvivenza media è di 14 mesi, anche a seguito di un'aggressiva asportazione chirurgica combinata con radioterapia e chemioterapia. Rari, ma presenti, sono i casi di sopravvivenza. Il tumore risulta composto da un'eterogenea popolazione di cellule tumorali astrocitiche scarsamente differenziate; colpisce soprattutto, ma non solo, gli adulti al di sopra dei 40 anni di età, e si presenta solitamente nella materia bianca subcorticale degli emisferi cerebrali. I siti più frequentemente affetti sono il lobo temporale, il lobo parietale, il lobo frontale e il lobo occipitale. La combinazione fronto-temporale è tipica (**Figura 16**).

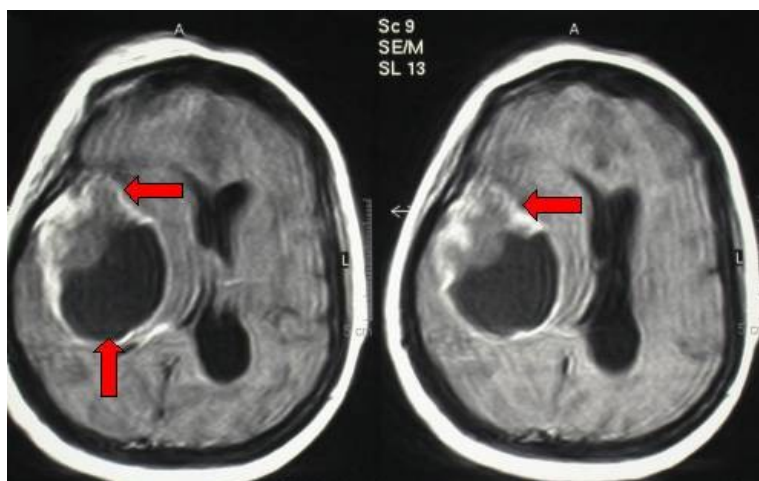


Figura 16. Tipico aspetto di glioblastoma multiforme temporale destro alla RMN in proiezione assiale.

Meno frequentemente il tumore è localizzato a livello del midollo spinale o del tronco cerebrale, ed in quest'ultimo caso riguarda più che altro i bambini. I glioblastomi intraventricolari sono eccezionali. Come tutti i tumori cerebrali, salvo rari casi, il glioblastoma non si espande oltre le strutture del SNC. Sulla base della presentazione clinica, il GBM può essere suddiviso in tipo primario

e secondario. I GBM primari per la maggior parte dei casi colpiscono pazienti anziani, mentre i GBM secondari sono più rari e tendono ad insorgere al di sotto dei 45 anni. Il GBM primario si presenta in modo acuto ed *ex novo*, senza alcuna evidenza di precedenti sintomi o di un antecedente tumore cerebrale a basso grado di malignità. Di contro, il GBM secondario deriva dalla progressiva trasformazione di un astrocitoma di basso grado (generalmente astrocitoma di grado II) in glioma di grado III/IV (**Figura 15**). Nonostante siano morfologicamente e clinicamente indistinguibili, i GBM primari e secondari sono tuttavia caratterizzati da marcate differenze a livello genomico, di *profiling* di RNA e proteine, e di risposta a chemio- e radioterapia che ne riflettono la differente storia clinica [66, 67]. Tra tutti i tipi di tumore solidi conosciuti, il glioblastoma multiforme è quello caratterizzato dal più alto grado di angiogenesi. Il fenotipo del GBM primario e secondario è caratterizzato infatti da una iperplasia microvascolare dovuta a cellule endoteliali che proliferano continuamente dai normali microvasi formando microaggregati, altresì noti come corpi glomeruloidi, che sono accompagnati da elementi stromali, quali periciti e lamina basale [68]. L'idea che i neo-capillari formati rappresentino per il tumore una fonte di sostentamento e una via di trasporto per le metastasi è fortemente supportata da studi su modelli animali, che hanno mostrato come i processi angiogenici permettano la sopravvivenza e la crescita della massa tumorale solida [69]. Una tipica caratteristica della transizione da astrocitoma di basso grado a GBM secondario è proprio il drammatico aumento della proliferazione microvascolare. Una proliferazione microvascolare ugualmente accentuata è stata osservata anche in casi di GBM primario. Si potrebbe conseguentemente pensare che l'acquisizione di talune alterazioni genetiche conduca all'attivazione di una comune *pathway* di angiogenesi. Sarà quindi necessaria la comprensione dei meccanismi molecolari che guidano il processo angiogenico nel GBM primario e secondario al fine di studiare delle terapie anti-angiogeniche che ne blocchino la progressione.

1.14.3 GENETICA DEL GLIOBLASTOMA MULTIFORME

Le cellule cancerose tendono ad accumulare molteplici aberrazioni cromosomiche, mutazioni geniche ed epigenetiche, che portano alla trasformazione maligna. Questi eventi mutazionali sono stati individuati attraverso analisi genetiche molecolari e conducono tipicamente all'attivazione di oncogeni o al silenziamento dei geni soppressori del tumore. L'accumulo di alcuni danni genetici permette la sopravvivenza e la progressiva trasformazione delle popolazioni cellulari anormali, che eventualmente portano alla formazione di un tumore. Le analisi genetiche negli ultimi 30 anni hanno definito i principali geni che risultano alterati nel genoma umano e che sono associati con la formazione di tumori cerebrali (**Figura 14**). Diversi studi hanno identificato la presenza del cromosoma 7 in un numero di copie anormale (*gain*) nei gliomi maligni; nel 1984 è stato identificato sullo stesso cromosoma il primo oncogene disregolato in questo modello tumorale: il gene codificante per il recettore del fattore di crescita epidermico EGFR [70].

Nel 1989, l'analisi cariotipica su astrocitomi ha identificato nei cromosomi 9, 10 e 17 alcuni loci, sede di geni soppressori di questo tumore [71]. In particolare, si è visto che il soppressore tumorale *TP53*, localizzato nel cromosoma 17, è tipicamente alterato anche nel glioblastoma multiforme. Nel 1993 e nel 1997 è stato scoperto che alcuni geni (tra cui l'inibitore del ciclo cellulare p16 e la fosfatasi *PTEN*, *phosphatase and tensin homolog*) sono tipicamente oncosoppressori deleti nei cromosomi 19 e 10 nel glioblastoma. Più precisamente, p16 può rallentare la progressione del ciclo cellulare, mentre PTEN è un regolatore negativo della *pathway* in cui è coinvolta la chinasi *PI(3)K* (*phosphoinositide 3-kinase*) [72]. Nel 2008 è stato scoperto che il gene codificante per l'*IDH1* (*isocitrate dehydrogenase 1*) è mutato in gliomi di basso grado e in un *subset* di glioblastomi [73]. La mutazione è altamente specifica e conduce alla sostituzione di un singolo aminoacido (l'arginina 132 con l'istidina) a livello del sito attivo dell'enzima. Quest'ultimo automaticamente perde la capacità di catalizzare la conversione dell'isocitrato in α -chetoglutarato. È stato proposto che questa specifica mutazione potrebbe

avere un indiretto effetto oncogenico: infatti, conduce all'attivazione della *pathway* di *HIF* (*Hypoxia Inducible Factor*), particolarmente critica per l'adattamento metabolico dei tumori alla crescita anaerobica e per la formazione di nuovi vasi sanguigni attraverso i processi angiogenici [74]. Nel 2008, inoltre, il progetto *The Cancer Genome Atlas (TCGA)* ha portato a termine uno studio comprensivo del glioblastoma multiforme e ha fornito dati importanti circa alcuni geni maggiormente coinvolti nella sua patogenesi ed una *network* dettagliata delle *pathways* che intervengono nell'insorgenza di tale tumore [75]. Mutazioni somatiche nel gene *NF1* (*neurofibromatosis type 1*) sono state riportate in una serie di glioblastoma [76]. *NF1* codifica per una proteina, chiamata neurofibromina, che è in grado di svolgere una regolazione negativa sull'attività dell'oncogene *p21ras*. Data la specifica attività della neurofibromina, il gene *NF1* può essere inquadrato nella categoria dei geni oncosoppressori. Sia la perdita dell'allele *wild type* del gene che la presenza di mutazioni somatiche puntiformi all'interno del gene possono determinare l'inattività della proteina stessa e sono state riscontrate in uno svariato numero di neurofibromi, glioblastomi, astrocitomi e neurofibrosarcomi.

Il gene *EGFR* mutato induce la proliferazione delle cellule tumorali di glioblastoma primario. Alla stessa famiglia dei recettori di membrana di *EGFR* appartiene anche *ErbB2*: diverse mutazioni somatiche di questo gene sono anche state ritrovate nel glioblastoma [77]. Mutazioni somatiche di *PI(3)K* sono state identificate nel glioblastoma umano. Il complesso consiste di una proteina cataliticamente attiva, *p110 α* , e una proteina regolatrice, *p85 α* . Tale complesso regola una *pathway* che nelle cellule normali è attivata dallo stimolo di alcun fattori di crescita ed è responsabile della proliferazione e della sopravvivenza cellulare [78, 79]. Per ottenere una visione integrata degli eventi genetici che si verificano nel glioblastoma, le principali alterazioni genetiche come mutazioni somatiche puntiformi, delezioni e amplificazioni locali, sono state inserite nelle principali *pathways* coinvolte in questo tipo di tumore cerebrale. Quest'analisi ha identificato una rete di mutazioni altamente interconnesse riguardanti la via di segnalazione di *PI(3)K* e le *pathways* del

fattore di trascrizione p53 e del soppressore del retinoblastoma (Rb) (**Figura 17**) [66].

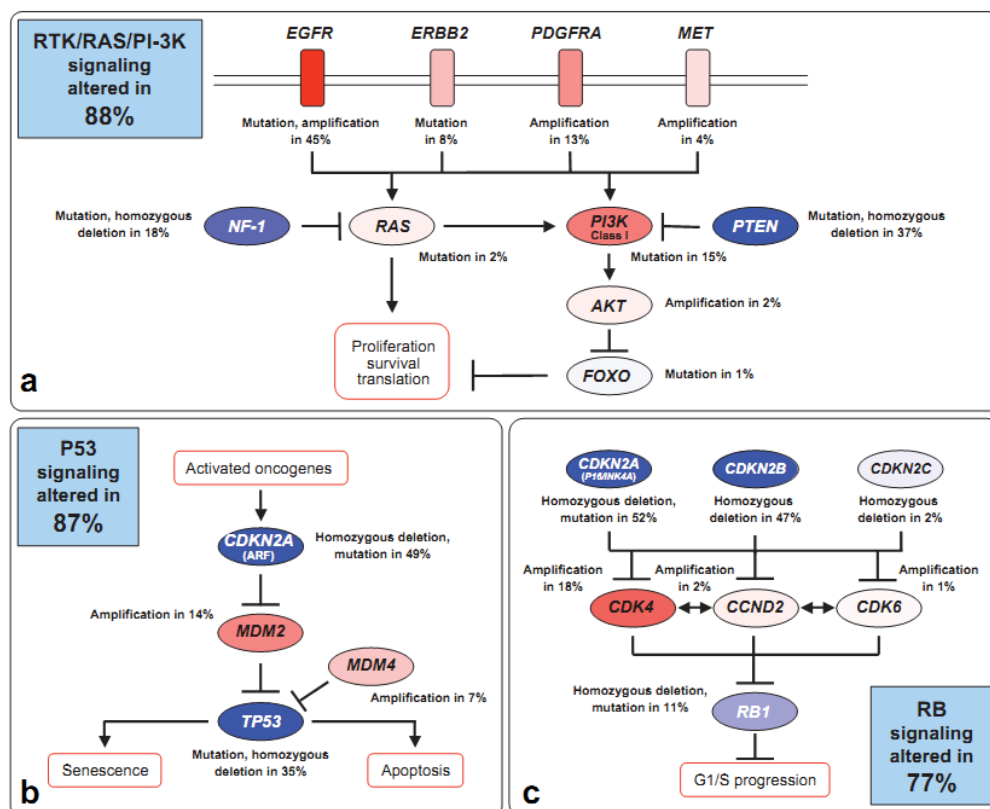


Figura 17. Frequenti alterazioni genetiche in tre *pathways* di segnalazione cellulare. Sono mostrate le mutazioni, come anche i cambiamenti significativi nel numero delle copie geniche, per i componenti della via RTK/RAS/PI(3)K (a), p53 (b) e Rb (c) (da Olson, *CA Cancer J Clin* 2010).

L'88% dei campioni di glioblastoma ha almeno un'alterazione nella *pathway* PI(3)K, che prevede mutazioni a livello dei recettori di membrana (EGFR, ErbB2, PDGRFA e MET); inoltre, è frequentemente alterato l'oncosoppressore NF1 (che normalmente regola negativamente la proteina G-RAS) a livello del complesso PI(3)K. L'inattivazione della *pathway* del fattore di trascrizione p53 (presente nell'87% dei casi di GBM) è dovuta all'amplificazione dei geni MDM2 e MDM4 (*Murine Double Minute 2* e *4*), che promuovono la sopravvivenza della cellula e la progressione del ciclo cellulare inibendo l'oncosoppressore TP53, oltre che alla mutazione del gene stesso. Il gene TP53 codifica per un fattore di trascrizione che svolge numerosi ruoli dal punto di

vista molecolare, tutti riconducibili alla modulazione negativa della proliferazione e della crescita cellulare in condizioni di stress (quali il danneggiamento del DNA oppure l'attivazione incontrollata di oncogeni): vengono così indotti l'arresto del ciclo cellulare, la riparazione del DNA, la senescenza o l'apoptosi della cellula. Il fine ultimo di questa regolazione negativa sulla crescita è impedire che una linea cellulare mutata possa espandersi, recando gravi danni all'organismo. Infine, per quanto riguarda la *pathway* del soppressore Rb, le aberrazioni più comuni riguardano i geni della famiglia delle proteine CDK (*Ciclin-Dependent Kinases*), importanti per il controllo del ciclo cellulare. La proteina Rb agisce normalmente da soppressore tumorale, poiché impedisce l'entrata della cellula nella fase S del ciclo cellulare attraverso l'inattivazione della famiglia dei fattori di trascrizione E2F, che sono essenziali per l'inizio della replicazione del DNA.

1.14.4 BASI MOLECOLARI DELLA RESISTENZA ALLA CHEMIOTERAPIA

Anche variazioni epigenetiche sono state identificate a carico delle cellule di glioblastoma. L'enzima *MGMT* (*Methyl Guanine Methyl Transferase*) è in grado di rimuovere gli addotti derivati da agenti alchilanti (ad esempio, gruppi metilici) dalla posizione 6 dell'ossigeno della guanina, e, in grado minore, dall'ossigeno in posizione 4 della timidina, mantenendo quindi la guanina o la timina nel DNA allo stato normale. Nel glioblastoma è stato visto che la metilazione del promotore di tale gene ne determina il silenziamento e dunque la mancata espressione della proteina. Ciò potrebbe favorire l'instabilità cromosomica indotta da certi farmaci, che si comportano come agenti alchilanti. Questo enzima, quando espresso, ripara il danno indotto dai farmaci e protegge la cellula tumorale; quando non è espresso, permette al farmaco di agire portando la cellula tumorale alla morte. Lo stato di metilazione del gene, che codifica per l'enzima *MGMT*, risulta dunque essere un importante *marker* di risposta al trattamento farmacologico con temozolomide, un agente alchilante attualmente utilizzato nella chemioterapia per il glioblastoma [80,

81]. I pazienti affetti da glioblastoma, che presentano una metilazione a livello del promotore del gene MGMT, risultano essere sensibili alla *temozolomide*, poiché i residui di guanina sono alchilati dal farmaco ma non vengono riparati; ciò rende le cellule cancerose maggiormente suscettibili all'evento apoptotico, portando a termine con successo la terapia. Nel caso in cui il paziente non presenti tale modificazione epigenetica non risponderà in modo adeguato al trattamento farmacologico: infatti, l'enzima verrà espresso e riuscirà a riparare i danni indotti dal farmaco alchilante, rendendo le cellule resistenti all'apoptosi e causando l'insuccesso della terapia **[80, 81]**. In aggiunta a queste ormai ben note alterazioni, per comprendere la biologia del glioblastoma sono sempre più prese in considerazione *pathways* come *Notch* ed *Hedgehog*, coinvolte nella regolazione dello sviluppo e del comportamento delle cellule staminali. Infatti, la biologia delle cellule staminali si sta sempre più sovrapponendo all'oncologia a causa dell'ipotesi dell'esistenza delle *cancer stem cells* e della constatazione che geni coinvolti in diverse *pathways* delle *stem cells* giocano anche un ruolo rilevante nel cancro **[66]**. Negli ultimi tempi, è stata possibile anche la comprensione degli eventi genetici che stanno alla base del processo di angiogenesi, richiesto per la crescita del glioma maligno **[82]**. Esiste una precisa via di segnalazione che coinvolge effettori dipendenti ed indipendenti dal fattore HIF (*Hypoxia Inducible Factor*). Si tratta di regolatori positivi del processo angiogenetico, quali *VEGF* (*Vascular endothelial growth factor*), *bFGF* (*basic Fibroblast Growth Factor*), angiopoietine, *PDGF* (*platelet-derived growth factor*), *IL-8* (*interleukin-8*), e di regolatori negativi, quali trombospodina 1 e 2, endostatina e interferoni. Nella maggior parte dei casi, l'angiogenesi è guidata dal fattore VEGF, secreto dal tumore; le cellule endoteliali, poste in vicinanza della massa tumorale, esprimono il recettore VEGFR2, che legando lo specifico ligando VEGF stabilisce una via di segnalazione paracrina in grado di stimolare la crescita e la proliferazione delle cellule endoteliali. E' stato visto che i livelli di VEGF, prodotto dal tumore, aumentano proporzionalmente al suo grado di malignità **[83]**.

1.14.5 NUOVI PROGRESSI NELLA CLASSIFICAZIONE DEL GLIOBLASTOMA UMANO

Fino a qualche tempo fa, la diagnosi dei tumori cerebrali era basata su una valutazione di tipo clinico-patologico. Questo approccio permetteva la distinzione di differenti gradi dentro categorie dello stesso tipo di tumore, come negli astrocitomi. Tuttavia, è divenuto evidente da studi di genetica e su pazienti che dentro ogni grado potrebbero essere presenti dei sottogruppi. Inoltre, studi di *profiling* nel glioblastoma hanno dimostrato che i profili trascrizionali riflettono la biologia di base del tumore e possono essere usati per predire la classificazione tumorale, il *patient outcome* e la risposta al trattamento [84]. Inoltre, uno degli obiettivi di questi studi è stato dimostrare che ogni tumore è unico nel suo profilo d'espressione e dunque è anche unico a livello biologico: ciò lascerebbe intuire che in futuro la Medicina potrebbe essere personalizzata. Sebbene questo rappresenta un obiettivo distante, è chiaro da questi studi che sarà presto possibile *clusterizzare* i profili dei pazienti di glioblastoma in sottotipi molecolari. Questa nuova tipologia di classificazione del glioblastoma darà la possibilità di selezionare terapie personalizzate per gruppi di pazienti, in modo tale da aumentare i successi terapeutici e migliorare l'*outcome* del paziente.

Inoltre eccitanti sviluppi in questo campo vengono dal TCGA (*The Cancer Genome Atlas*), uno sforzo senza precedenti sponsorizzato dall'NIH (*National Institute of Health*) per comprendere il tumore attraverso l'integrazione dei dati del profilo d'espressione e quelli di genetica. Il glioblastoma è uno dei tumori che ha ricevuto priorità per le analisi da parte del TCGA Consortium [75]. Cinquecento campioni di glioblastoma multiforme, provenienti dai principali centri americani di tumore cerebrale, sono stati inviati a differenti centri di analisi genetica per meglio caratterizzare le alterazioni tipiche a livello del DNA (in termini di numero di copie dei geni, di sequenziamento genico e di metilazione epigenetica), dell'mRNA (in termini di profilo dell'espressione genica) e dei miRNA. Sebbene queste analisi siano ancora in corso, sono state

scoperte nuove alterazioni genetiche e sono state ottenute evidenze preliminari che il glioblastoma può essere suddiviso in parecchi sottotipi (**Figura 14**).

Il primo sottotipo è caratterizzato da cellule altamente proliferanti ed è stato definito “classico”. I tumori di questo gruppo mostrano *gain* a livello del cromosoma 7, delezione (*loss*) nel cromosoma 10 nel 93% dei casi e frequente condizione di *loss* localizzata nella banda p21.3 del cromosoma 9 (95%). Questi eventi conducono rispettivamente all’amplificazione del gene EGFR, alla perdita del locus genico di PTEN e di CDKN2A. Alterazioni nei geni TP53, NF1, PDGFRA o IDH1 sono scarsamente presenti. La forma classica di GBM mostra responsività alla radioterapia e alla chemioterapia. Per quanto concerne il profilo d’espressione, questo sottotipo di GBM mostra una elevata espressione di NES, *markers* di precursori neurali e cellule staminali, e attivazione delle *pathways* Notch e Sonic Hedgehog [66]. Il secondo sottotipo di GBM è associato al mesenchima cerebrale ed è caratterizzato da una spiccata angiogenesi, dalla sovraespressione dei geni CHI3L1/YKL40 e MET, come pure dei *markers* astrocitari CD44 e MERTK, e dall’attivazione della *pathway* di NFκB. Questo gruppo di GBM, chiamato *mesenchimale*, presenta la frequente inattivazione dei geni NF1 (37%), TP53 (32%) e PTEN (32%). Questi tumori dimostrano sensibilità alla terapia di chemioradiazione e potrebbero, in aggiunta, essere responsivi agli inibitori di Ras e PI(3)K ed a quelli dell’angiogenesi [66]. Un terzo sottotipo, chiamato *proneurale*, ha un profilo di espressione che ricorda l’attivazione genica tipica dello sviluppo neuronale in quanto è caratterizzato da alti livelli di espressione di geni dello sviluppo oligodendrocitico e proneurale. A questo gruppo appartengono pazienti di giovane età, che mostrano tipicamente la sovraespressione o l’amplificazione/mutazione del gene PDGFRA e la mutazione del gene IDH1. Sono state osservate anche frequenti mutazioni nei geni TP53 e PIK3CA/PIK3R1. Il *gain* del cromosoma 7 e il *loss* del cromosoma 10 sono significativi, ma meno frequenti rispetto al sottotipo di GBM classico. Questo sottotipo potrebbe essere molto sensibile ad inibitori del fattore HIF ed a inibitori delle *pathways* PI(3)K e PDGFRA. Il quarto sottotipo di GBM,

definito *neurale*, è meno definito e ha caratteristiche molto simili a quelle ritrovate nel normale tessuto nervoso, poiché mostra l'attivazione di *markers* neuronali come NEFL, GABRA1, SYT1 e SLC12A5 [66].

Il paragone dei *pattern* dell'espressione genica dei quattro sottotipi di GBM con quelli delle colture primarie di astrociti, oligodendrociti e neuroni murini suggerisce che i diversi sottotipi tumorali potrebbero aver preso origine da differenti cellule, un'ipotesi che però necessita di ulteriori convalidazioni [85, 86]. Nonostante la classificazione del GBM potrebbe essere utile per definire i migliori *targets* molecolari all'interno di ogni sottotipo, bisogna riconoscere che tutti i sottogruppi mostrano sempre l'inattivazione delle *pathways* p53 e Rb e l'attivazione della *pathway* dei recettori tirosin-chinasici (**Figura 14**) [75].

1.14.6 NUOVI SVILUPPI NELLA TERAPIA ANTITUMORALE SPECIFICA PER IL GBM

In generale, la terapia antitumorale specifica per il GBM prevede:

- chirurgia;
- radioterapia;
- chemioterapia,

non necessariamente in quest'ordine.

Talvolta infatti il glioblastoma risulta inizialmente inoperabile e si ricorre in prima istanza alla radioterapia e/o alla chemioterapia allo scopo di ridurre la massa tumorale e dare la possibilità al neurochirurgo di intervenire successivamente. Se la tipologia e la posizione del tumore lo consentono, viene sempre effettuata la resezione macroscopica completa della lesione tumorale per intervento chirurgico (**Figura 18**).

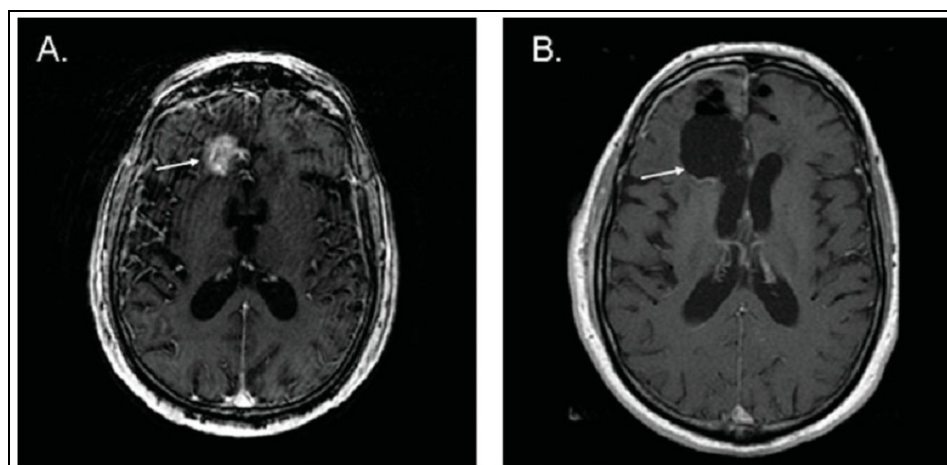


Figura 18. (A) Immagine di Risonanza magnetica nucleare (MRI) prima della resezione della lesione tumorale; (B) dopo intervento chirurgico.

Non è possibile effettuare tale tipo di intervento nei cosiddetti "glioblastomi a farfalla" che tendono a interessare entrambi i lobi cerebrali, coinvolgendo il corpo calloso. Nuove tecniche chirurgiche, come la resezione guidata da fluorescenza (**Figura 19**) e approcci neuroendoscopici, sono divenute ultimamente importanti nel trattamento del glioma maligno.

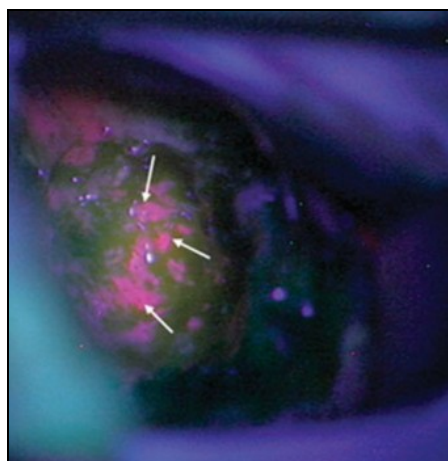


Figura 19. Visione microscopica intraoperatoria del glioblastoma mutiforme. La fluorescenza rosa (indicata dalle frecce) indica la presenza della massa tumorale e quindi il punto di resezione chirurgica (da Olson, *CA Cancer J Clin* 2010).

Attualmente la radioterapia vanta di tre possibili approcci: la radioterapia convenzionale (cobaltoterapia), la radiochirurgia stereotassica ed i radioisotopi. La cobaltoterapia è la metodica più comune. Ha un effetto necrotico sulle cellule tumorali, ma anche sul tessuto circostante sano, che inevitabilmente

risulta danneggiato: è dunque necessario somministrare dosi frazionate di radiazioni in varie sedute. Tale approccio non è immune da seri effetti collaterali, tra i quali il calo delle capacità intellettive e di quelle visive.

La radiocirurgia stereotassica ha il pregio di colpire solamente la lesione tumorale senza che vi siano danni al tessuto sano che circonda il tumore. Di solito il trattamento consta di un'unica seduta. Quest'ultima tecnica viene ritenuta più precisa, ma è decisamente molto più costosa. Il trattamento radiocirurgico è molto meno invasivo rispetto alla cobaltoterapia e presenta pertanto minori effetti collaterali, ma è indicato solo per lesioni tumorali che non superino i 30 mm. Nei pazienti con recidiva, che hanno già subito l'irradiazione ed in cui un nuovo intervento chirurgico sarebbe eccessivamente rischioso, è possibile l'impianto di radioisotopi direttamente nella massa tumorale. Per quanto riguarda la chemioterapia, i farmaci più usati nel trattamento di questa neoplasia sono: *ACNU*, *BCNU* e *Temozolomide* (nome commerciale *Temodal*[®]). L'uso della *Temozolomide* contemporaneamente e dopo radioterapia gode di un'ampia applicabilità data la semplice somministrazione ed un profilo di tossicità favorevole, se comparato con più vecchi agenti alchilanti come la *Carmustina*. Inoltre, uno studio comprensivo di tutte le alterazioni genetiche e dei cambiamenti d'espressione genica caratteristici del GBM ha permesso di introdurre nella pratica clinica delle innovative terapie molecolari mirate. L'entusiasmo per i progressi terapeutici effettuati negli ultimi tempi deve tuttavia essere moderato, poichè questo tipo di tumore cerebrale può divenire resistente alle diverse terapie, a causa dell'intrinseca capacità di riparare il danno indotto dalle stesse attraverso una proliferazione cellulare aberrante ed amplificata [66].

1.14.7 TERAPIE MOLECOLARI APPLICATE AL TRATTAMENTO DEL GLIOBLASTOMA MULTIFORME

Lo studio comprensivo di tutte le alterazioni genetiche tipiche del glioblastoma ha permesso di creare una prima generazione di farmaci in grado di colpire

specifici *targets* cellulari e, conseguentemente, inibire determinate *pathways* all'interno delle cellule tumorali.

Le *pathways* che coinvolgono fattori di crescita e che stimolano la proliferazione cellulare vengono costitutivamente attivate nei gliomi maligni, poiché si ha una sovraespressione o un'amplificazione dei geni codificanti EGFR, ERBB2, PDGFRA, MET. Inoltre, sono state riscontrate diverse mutazioni geniche che conducono ad un incremento del segnale cellulare in modo del tutto indipendente dal ligando. Ad esempio, EGFRvIII (variante del recettore EGFR) manca del dominio extracellulare e non potendo legare lo specifico ligando invia costitutivamente un segnale di crescita, inducendo la cellula a proliferare in modo del tutto incontrollato [66]. Molti farmaci di prima generazione hanno puntato conseguentemente al *targeting* dei recettori dei fattori di crescita, posti sulla superficie delle cellule tumorali. EGFR è stato considerato come uno dei più attraenti *targets* terapeutici per il GBM [66, 87]. Il gene che codifica per il fattore di crescita epidermico (EGFR) è amplificato e sovraespresso in circa il 40% dei casi di GBM primario, specialmente in quello di tipo *classico*. Quasi la metà dei tumori, che mostrano un'amplificazione di EGFR, sono caratterizzati dalla variante recettoriale EGFRvIII che possiede un epitopo tumore-specifico, non ritrovato nella forma *wild-type* del recettore, e che rappresenta dunque un potenziale *target* terapeutico. Un'attivazione costitutiva ed incontrollata della *pathway*, controllata da questo fattore di crescita, provoca la proliferazione delle cellule tumorali, l'inibizione dell'apoptosi e l'angiogenesi [66]. Piccole molecole inibitrici di EGFR, come *gefitinib* ed *erlotinib*, sono ben tollerate dai pazienti affetti da gliomi maligni, ma le risposte positive sono poco frequenti e la sopravvivenza libera da progressione (PFS) non è prolungata nel tempo. Inoltre, né il *lapatanib* (un altro inibitore di EGFR), né il *cetuximab* (un anticorpo monoclonale diretto contro EGFR) hanno dimostrato di essere efficaci. Recenti studi hanno combinato l'utilizzo degli inibitori di EGFR con la *temozolomide* e la radioterapia in pazienti in cui il GBM era stato diagnosticato da poco. Anche in questo caso sono stati osservati risultati poco convincenti [87-90]. Il gene che

codifica per PDGFR e quello per il ligando PDGF sono anch'essi sovraespressi in gliomi maligni, specialmente nel tipo *proneurale* [60, 85, 91]. L'inibitore di PDGFR, *imatinib*, possiede una significativa attività antitumorale sia *in vitro* che in modelli di glioma ortotopici [92]. Sfortunatamente, il farmaco risulta essere inattivo nei *trials* clinici, poichè si sono avute rare risposte positive al trattamento e non si è notato un prolungamento della PFS [93]. Sono in corso studi che prendono in considerazione inibitori di PDGFR più potenti. Altri farmaci molecolari mirano al *targeting* di molecole responsabili del *signaling* intracellulare.

La *pathway* PI(3)K è fondamentale nella regolazione del metabolismo, della crescita, della proliferazione e della sopravvivenza delle cellule tumorali. Il legame del ligando al recettore di tipo tirosinchinasico aumenta l'attività della *pathway* stessa e provoca l'attivazione di mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*). Gli effettori a valle di mTOR hanno una serie di funzioni biologiche a livello delle cellule tumorali, quali l'adattamento all'ipossia e la sintesi proteica. Nei gliomi maligni, tale via di segnalazione è attivata dall'aumentata attività dei recettori tirosin-chinasi quali EGFR, PDGFR e MET, dalle subunità mutate oncogeniche del complesso PI(3)K e/o dalla perdita dell'oncosoppressore PTEN [94]. Conseguentemente, si stanno valutando diversi inibitori di mTOR per la cura dei gliomi maligni. Ad oggi, tali inibitori hanno mostrato solo una minima attività terapeutica [95-96]. Terapie che bersagliano il *signaling* intercellulare sembrano invece avere una funzione anti-angiogenica. A riguardo, la maggior parte dei farmaci valutati nei *trials* clinici tentano di interferire con la *pathway* di VEGF, bloccandone direttamente il ligando o il recettore, ad esempio utilizzando un anticorpo monoclonale, il *bevacizumab*, diretto contro VEGFR [97]. Sulla base di un modesto profilo di tossicità e di una veloce risposta radiografica, la FDA (*US Food and Drug Administration*) ha ammesso l'uso del *bevacizumab* nel trattamento ricorrente del GBM. Vi è comunque un crescente interesse nello scoprire altri *targets* pro-angiogenici che funzionino mediante meccanismi alternativi [97]. A causa del ruolo che PDGFR ha nel reclutare i pericitici [98],

l'inibizione di questo recettore potrebbe essere utile. Sono dunque in corso diversi studi con inibitori di PDGFR e inibitori combinati di VEGFR/PDGFR. I risultati ottenuti dai farmaci molecolari di prima generazione sono stati deludenti a causa delle rare risposte radiografiche e della mancanza di significativi casi di prolungamento della PFS.

Un tentativo compiuto per migliorare questi risultati iniziali è stato quello di combinare nuove terapie molecolari con trattamenti standard, quali radiazioni e chemioterapia.

Grazie agli studi di *profiling* molecolare e alle analisi delle *networks*, si stanno scoprendo rapidamente nuovi geni *targets* che potrebbero contribuire a determinare una maggiore suscettibilità delle cellule tumorali all'apoptosi.

Tra i più promettenti *targets* terapeutici ritroviamo MET (*Mesenchymal Epithelial Transition Factor*), FGFR (*Fibroblast Growth Factor Receptor*), Hsp 90 (*Heat Shock Protein-90*), HIF1 (*Hypoxia Inducible Factor 1*), CDK (*Cyclin Dependent Kinase*). Poiché si sta valutando sempre più l'ipotesi che le cellule di glioma *stem-like* possano iniziare la formazione del tumore e mantenere la massa tumorale, sono molto promettenti nuove terapie che puntano all'inibizione di *targets* specifici di tali cellule, come *Notch* e *Sonic Hedgehog* [65, 99].

Farmaci che inibiscono singoli *targets* potrebbero anche essere combinati per ottenere un'inibizione multipla di diversi *targets*. E' stato dato molto interesse alla combinazione degli inibitori di EGFR con gli inibitori di mTOR.

Un importante ostacolo da superare rimane comunque l'aumentata tossicità della terapia, che limiterebbe le dosi tollerate dai pazienti. Per esempio, la combinazione degli inibitori di EGFR con gli inibitori mTOR è stata associata ad un'alta incidenza di tossicità dermatologica e mucosite [100]. Un altro fattore che potrebbe interferire con l'efficacia di questi farmaci è l'insufficiente penetrazione dell'agente terapeutico nel tessuto tumorale, dovuta alla barriera emato-encefalica parzialmente intatta o ad un trasportatore che provoca l'efflusso del farmaco.

A causa della difficoltà di ottenere tessuti cerebrali tumorali dai pazienti affetti da GBM, solo in pochi *trials* clinici è stato possibile misurare i livelli di farmaco nel tessuto tumorale. Tuttavia questo *step* è critico per ottenere e studiare nuovi agenti molecolari di interesse terapeutico [101]. *Trials* clinici che incorporano il tessuto tumorale e degli specifici *targets* molecolari aiuteranno in futuro a comprendere perché certi farmaci hanno successo o falliscono in casi individuali di GBM. Nonostante i risultati iniziali, i ricercatori sono ottimisti circa l'utilizzo dei farmaci che bersagliano specifici *targets* tumorali: terapie molecolari caratterizzate da una duratura efficacia antitumorale potrebbero essere realizzate entro il 2020.

1.15 miRNA E GLIOBLASTOMA: *THE STEM CELL CONNECTION*

Recenti dati indicano che vi sono interessanti analogie tra i tumori (inclusi i tumori cerebrali gliali), le cellule staminali e le cellule progenitrici. Allo stesso tempo, è divenuto chiaro che i miRNA svolgono uno dei maggiori ruoli nella regolazione della biologia delle cellule staminali, nel differenziamento e nell'identità cellulare. Per esempio, i miRNA sono stati implicati nella regolazione del differenziamento neurale. Studi effettuati sul glioblastoma hanno suggerito che i miRNA coinvolti nello sviluppo neuronale giochino un ruolo importante in questa neoplasia. Distinti *pattern* d'espressione dei miRNA sono stati osservati in molti tumori inclusi i glioblastomi: il significato funzionale di alcuni di questi miRNA alterati sta iniziando ad emergere [102-105]. Questi dati indicano che i miRNA giocano un ruolo importanti in molte caratteristiche del glioblastoma, incluse la proliferazione cellulare, l'invasività, l'angiogenesi e anche le cellule staminali.

1.15.1 CELLULE STAMINALI E GLIOBLASTOMA

Di recente, è stato ipotizzato nella leucemia e nel tumore al seno, che i carcinomi potrebbero includere una piccola percentuale di cellule che mantengono le proprietà staminali e che queste cellule siano il *subset*

tumorigenico tissutale [106, 107]. Simili subpopolazioni di cellule sono state successivamente isolate da altri tipi tumorali, incluso il glioblastoma [108]. In questi studi, le cellule tumorali dei pazienti sono state separate sulla base dell'espressione di un putativo *marker* delle cellule staminali, CD133. La popolazione cellulare CD133⁺ è altamente tumorigenica *in vivo*, mentre quella presentante il *marker* CD133⁻ non è neoplastica. Le cellule CD133⁺ mostrano anche aumentata resistenza a radiazioni e chemioterapia [109] ed aumentato potenziale angiogenico [110]. Questi dati hanno portato l'ipotesi che i glioblastomi siano mantenuti da una piccola popolazione di cellule staminali cancerose, e che terapie efficaci dovrebbero eliminare questa popolazione resistente. È chiaro che il glioblastoma presenta molte similarità con le cellule staminali neurali. Le cellule del glioblastoma possono andare in crescita senza difficoltà sotto condizioni originariamente designate per l'isolamento delle cellule staminali neurali, proliferare indefinitamente, rinnovarsi e possono essere indotte a differenziarsi in linee neurali, astrocitiche e oligodendrocitiche, similmente alle cellule staminali neurali normali [108]. Le proteine associate con le cellule staminali e progenitrici (Nestin, Bmi-1, Olig2, Sox2) sono anche altamente espresse nel glioblastoma [111]. Sebbene le cellule di glioma possano sfruttare meccanismi di auto-rinnovamento per proliferare illimitatamente, è anche chiaro che i meccanismi che permettono alle cellule staminali neurali normali e alle cellule progenitrici di differenziarsi possano essere inattivi nel glioblastoma. Il comprendere come i glioblastomi rimangano in questo stato di staminalità (lo stato indifferenziato) permetterà lo sviluppo di nuove terapie, che potrebbero promuovere il differenziamento o il *target* terapeutico del glioblastoma. Parecchi dei miRNA finora associati con il glioblastoma potrebbero normalmente funzionare per regolare il *self-renewal* delle cellule staminali e il differenziamento durante lo sviluppo e la loro disfunzione potrebbe contribuire al mantenimento di un indifferenziato fenotipo proliferativo, silenziando l'espressione dei *targets* coinvolti nel differenziamento e di contro permettendo l'espressione di quei *targets* coinvolti nel *self-renewal* staminale.

1.15.2 ALTERAZIONI DEI miRNA NEL GLIOBLASTOMA MULTIFORME

Un caratteristico *pattern* d'espressione dei miRNA è stato identificato nel glioblastoma. Secondo studi recenti, il miR-21 presenta un alto livello d'espressione nel glioblastoma, mentre parecchi miRNA sono sottoespressi in paragone con *brain* normale: tra questi vi sono il miR-7, il miR-124, il miR-128. Recenti pubblicazioni nel *dataset* del TCGA contengono informazioni sull'espressione e mutazioni dei miRNA (come delezioni ed amplificazioni), che potrebbero divenire importanti risorse per stabilire il ruolo dei miRNA nel glioblastoma. Lo studio di *profiling* dei miRNA in altri tumori cerebrali è ancora nella fase iniziale. Secondo un recente *report*, in cui sono stati analizzati tramite RT-PCR 248 miRNA in 14 medulloblastomi, paragonati a 7 controlli cerebrali normali e fetali, sono state trovate alcune similitudini con il glioblastoma; in particolare, il miR-21 è sovraespresso, mentre miR-7, miR-124, miR-128 sono sottoespressi. Il miR-137, che è sottoespresso nel glioblastoma, è invece sovraespresso in campioni di medulloblastoma. Altri studi mostrano il miR-199-5p è sottoespresso ed associato con metastasi nel medulloblastoma [112, 113]. In conclusione, i miRNA sembrano essere coinvolti nell'espressione di numerosi geni in *pathways* tumorali. La **Figura 20** mostra la *pathway* di segnalazione che ha origine dal recettore per l'EGFR, uno dei principali regolatori della tumorigenesi nel glioblastoma e in altri tumori, ed il coinvolgimento dei miRNA.

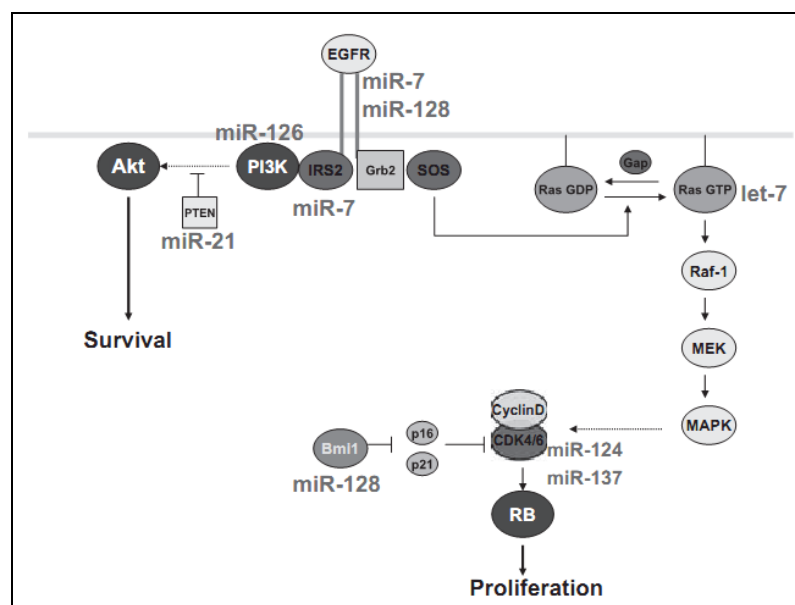


Figura 20. miRNA nella *pathway* di segnalazione dell'oncogene EGFR. Il *targeting* di PTEN da parte del miR-21 e PI3K dal miR-126 è stato dimostrato nel glioblastoma.

E' stato dimostrato che i miR-124 e miR-7, che sono altamente espressi in neuroni ma non nelle cellule progenitrici neurali, svolgono un ruolo importante nella promozione dello sviluppo neurale. Ci sono molti miRNA debolmente espressi nel glioblastoma. Similmente, il miR-128 è debolmente espresso nel glioblastoma ed altamente espresso nei neuroni, sebbene la sua funzione non è chiara, ma potrebbe controllare il *self-renewal* in entrambe le cellule normali e tumorali.

2. MATERIALI E METODI

2.1 COLTURE CELLULARI

Per questo progetto abbiamo utilizzato la linea cellulare di Glioblastoma Multiforme (GBM) U87MG. Le cellule sono state coltivate in una miscela di MEM con aggiunta di siero bovino fetale (FBS) al 10%, sodio piruvato (NaPyr) all'1%, amminoacidi non essenziali (NEEA) all'1%, penicillina/streptomicina all'0.1%. Le cellule sono state mantenute a 37°C in una percentuale di CO₂ pari al 5%.

2.2 *REAL TIME PCR*

La *Real Time PCR* è un metodo per la simultanea amplificazione e quantificazione del DNA: la quantità di prodotto amplificato è correlata all'intensità della fluorescenza tramite l'utilizzo di molecola fluorescente *reporter*. Piuttosto che rilevare l'ammontare totale del prodotto amplificato alla fine dei cicli di PCR, la massa dei prodotti della reazione viene determinata a partire dal ciclo in cui l'amplificato diventa rilevabile, definito ciclo soglia (Ct): ciò permette di ottenere risultati molto più accurati rispetto alla PCR tradizionale *end point*. Il primo ciclo, nel quale lo strumento riesce a discriminare il valore della fluorescenza prodotta e rilevarne il livello al di sopra del rumore di fondo (*background*), è definito *Ct* o ciclo soglia (**Figura 21**).

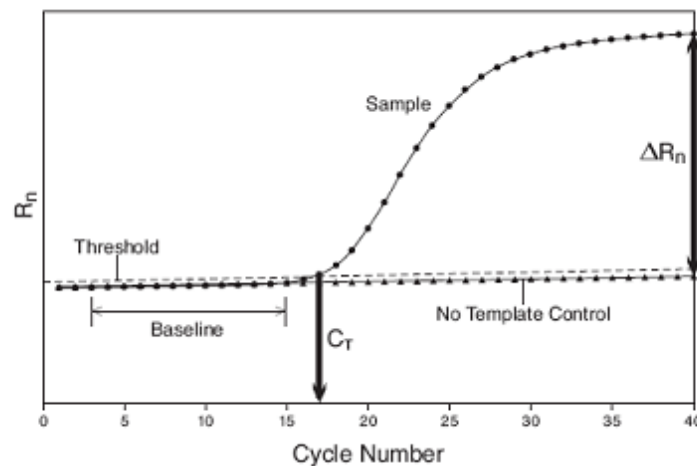


Figura 21. Tipica curva di amplificazione di una PCR. Il ciclo soglia (C_t) è indicato dall'intersezione della linea di *threshold* con la curva di amplificazione (da TaqMan Gene Expression Master Mix Protocol).

Il valore del C_t può essere direttamente correlato alla concentrazione iniziale del *target*: più elevata è la quantità di *DNA template* nel campione all'inizio della reazione, più basso sarà il valore del C_t di quel campione. 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*. Esistono due metodologie di quantificazione di base e ciascuna è adatta ad essere impiegata per applicazioni diverse: la quantificazione assoluta e la 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, valori 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 Ct 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.

2.2.1 QUANTIFICAZIONE MEDIANTE *SYBR GREEN*

Il *SYBR GREEN* è un composto aromatico dotato di attività fluorofora, che si comporta da agente intercalante in grado di legarsi preferenzialmente al DNA a doppio filamento e si inserisce a livello del solco minore del DNA (**Figura 22**).

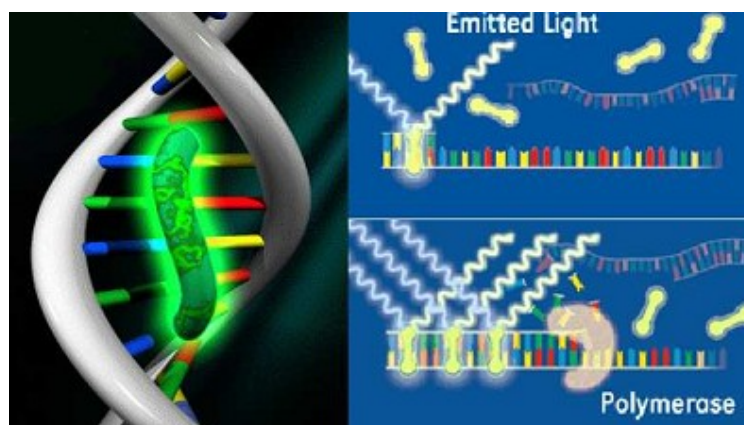


Figura 22. Meccanismo con cui il *SYBR green* agisce sul DNA a doppio filamento durante la fase di allungamento della PCR.

Durante la reazione di amplificazione il *SYBR green* si lega alle doppie eliche, causando un incremento della fluorescenza che corrisponde all'aumento del numero di copie dell'amplicone; la molecola fluorescente si lega aspecificamente a tutte le doppie eliche, includendo i dimeri di *primers* ed

eventuali prodotti aspecifici. Dopo l'amplificazione, i campioni vengono riscaldati e la variazione della fluorescenza viene monitorata per generare una curva di dissociazione (**Figura 21**).

2.2.2 QUANTIFICAZIONE MEDIANTE IL SAGGIO *TaqMan*

Le sonde TaqMan sono sonde ad ibridazione, specifiche per il frammento di interesse e 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. 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 viene 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 e determina la separazione del *reporter* dal *quencher* con una conseguente emissione di fluorescenza (**Figura 23**).

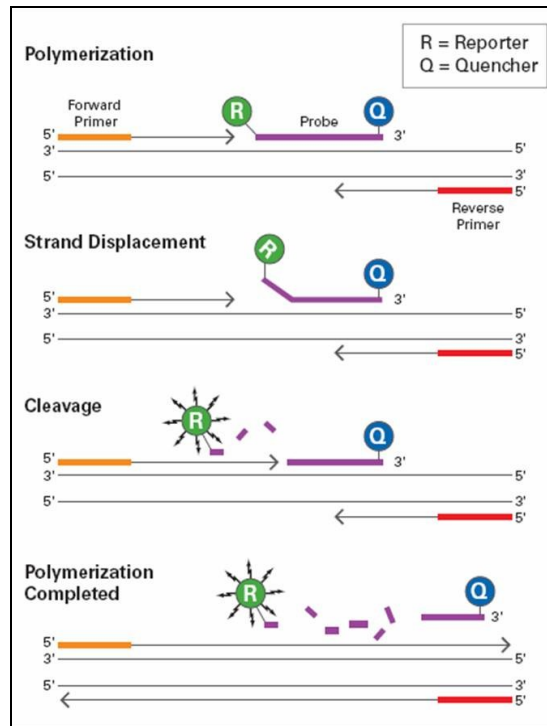


Figura 23. Meccanismo di rilevazione del segnale fluorescente mediante le sonde TaqMan: la vicinanza tra *quencher* e *reporter* impedisce l'emissione della fluorescenza; il segnale viene emesso dal *reporter* solo in seguito alla digestione della sonda da parte della polimerasi durante l'estensione.

2.3 MAPPATURA COMPUTAZIONALE DEL GENE CODIFICANTE IL miR-671 ALL'INTERNO DEL QUARTO ESONE DEL GENE CHPF2

La sequenza in formato *FASTA* dell'hsa-pre-miR-671, ricavata dal *database* miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/>), è stata allineata tramite BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con il cDNA in formato *FASTA* del gene ospite CHPF2, disponibile su Gene di NCBI (*National Centre for Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.4 ANALISI EVOLUTIVA DEL GENE CHPF2 E DEL miR-671

CHPF2:

La sequenza genomica di CHPF2 di *Homo sapiens* in formato *FASTA* (reperibile su Gene) è stata allineata tramite *BLASTN* con il DNA genomico in formato *FASTA* del gene di tutte le specie forniteci dal *database* in questione; questo *tool* ci ha consentito, allineando queste sequenze, di ricercare il grado di omologia tra le diverse specie. La sequenza in formato *FASTA* di CHPF2 di *Homo sapiens* è stata inoltre allineata tramite *BLASTN* contro tutto il genoma di *Homo sapiens* al fine di verificare la presenza di eventuali geni paraloghi. Inoltre, è stato effettuato un *BLASTP* tra la sequenza in formato *FASTA* della proteina CHPF2 di *Homo sapiens*, attualmente annotata su *Gene*, contro tutto il *refseq-protein* di *Homo sapiens* forniteci dal *database* al fine di ricercare il grado di omologia con altre proteine umane.

MIR671:

Utilizzando il *tool* BLAST abbiamo allineato la sequenza del pre-miR-671 in formato *FASTA* con il DNA genomico di CHPF2 in tutte le specie forniteci dal *database*. Inoltre, la sequenza del pre-miR-671 è stata allineata tramite *BLASTN* con il genoma di *Homo sapiens* al fine di verificare la presenza di eventuali geni paraloghi.

2.5 IDENTIFICAZIONE COMPUTAZIONALE DI QUATTRO ISOFORME DI RNA MESSAGGERO CODIFICANTI CHPF2

Al fine di identificare possibili varianti trascrizionali del gene CHPF2 in *Homo sapiens*, abbiamo scaricato le sequenze in formato *FASTA* delle *EST* del gene da UniGene di NCBI. Tali sequenze sono state allineate tra di loro attraverso il *tool* ESTannotator (<http://genome.dkfz-heidelberg.de>). Infine, per definire la struttura esone/introne, ciascuna di tali *assemblies* è stato allineata con la sequenza genomica del locus genico di CHPF2 utilizzando il *tool* Spidey (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/spidey/spideywebeg.html>). Le quattro varianti trascrizionali ottenute sono state denominate *Long1*, *Long2*, *Short*, *Monoexonic*.

2.6 ESPRESSIONE DELLE ISOFORME DI mRNA DEL GENE CHPF2 SINTETIZZATE IN DIVERSI TESSUTI ED ORGANI

Tramite *Real Time* PCR abbiamo analizzato l'espressione di due delle quattro varianti trascrizionali di CHPF2 nel pannello di tessuti ed organi RNA Ambion®. Ciò è stato possibile utilizzando coppie di *primers* specifiche, che hanno messo in evidenza in modo univoco le isoforme *Long2* e *Monoexonic*. Le sequenze sono state reperite da Gene per *Long2* e dall'analisi sull'assemblaggio delle *EST* per la isoforma *Monoexonic*. La coppia di *primers* specifica per *Long2* è stata disegnata sul quarto esone di CHPF2, a valle del pre-miR-671; la coppia di *primers* per la isoforma *Monoexonic* è stata disegnata sull'unico esone che essa presenta. Le coppie così ottenute sono state successivamente testate utilizzando il programma di PCR elettronica *ASePCR* (www.asepcr.com) e sono mostrate nella **Tabella 2**:

Tabella 2. Coppie di *primers* utilizzate per l'analisi mediante *Real Time PCR* delle isoforme trascrizionali di *CHPF2 Long2* e *Monoexonic*.

PRIMERS	SEQUENZA	AMPLIMERO (bp)
Long2 Fw	5' GCAGGCCAATAGCACTTA 3'	107
Long2 Rev	5' ATTCTCTATCTGTCCACCATCTT 3'	
Monoexonic Fw	5' AAGGGTGCTCCTACTCAGCA 3'	239
Monoexonic Rev	5' AGCCAGAAAATCCTCCCAAT 3'	

Nella prima fase dell'analisi molecolare, abbiamo effettuato la retrotrascrizione dell'RNA totale purificato dai 19 tessuti ed organi **RNA Ambion[®]** (*adipose; bladder; brain; cervix; colon; esophagus; heart; kidney; lung; ovary; placenta; prostate; skeletal muscle; small intestine; spleen; testes; thymus; thyroid; trachea*). 1 µg di RNA totale è stato retrotrascritto usando il kit commerciale *High Capacity RNA to cDNA Kit* (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). La reazione è stata eseguita in un *Thermal Cycler Biometra* secondo i seguenti *steps* (70°C, 10'; 37°C, 60'; 95°C, 5'). I campioni di cDNA ottenuti, miscelati con *Fast SYBR Green Master Mix 2X* (*Applied Biosystems*) e con le coppie di *primers* specifiche, sono stati quindi utilizzati per l'analisi dei trascritti delle due isoforme *Long2* e *Monoexonic* mediante *Real Time PCR*. La reazione è stata eseguita in un apparecchio *7900HT Fast Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*). L'organo scelto come calibratore per la nostra analisi è stata la prostata del pannello *RNA Ambion[®]*. Il profilo termico della reazione di *Real Time PCR* è stato il seguente: 95°C, 20''; 40 cicli a 95°C, 1''; 60°C, 20''.

2.7 VALIDAZIONE SPERIMENTALE E SEQUENZIAMENTO DELL'ISOFORMA *SHORT*

Dopo aver identificato le isoforme trascrizionali del gene *CHPF2*, abbiamo proceduto con la validazione e successivo sequenziamento dell'isoforma *Short*. Utilizzando il programma Primer3, abbiamo disegnato un'unica coppia di *primers* nel quarto esone per l'isoforma *Long2*, a monte e a valle del pre-miR-671, in una posizione che nella *Short* è corrispondente alla giunzione tra il quarto ed il quinto esone (**Tabella 3** e **Figura 24**);

Tabella 3. Coppie di *primers* utilizzate per la validazione dell'isoforma *Short*.

<i>PRIMERS</i>	<i>SEQUENZA</i>	<i>AMPLIMERO (bp)</i>
Long/Short Fw	5' CTTTGCAGCCAATGTCCTG 3'	842/413
Long/Short Rev	5' GGGCTGAGGCAGACAAAG 3'	

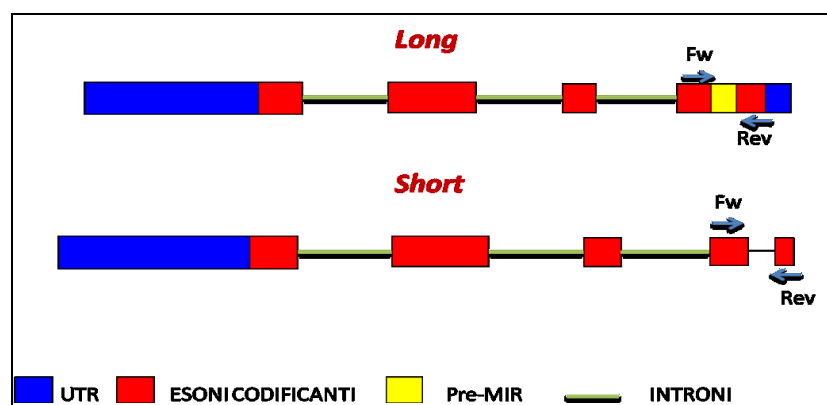


Figura 24 La figura mostra le posizioni in cui è stata disegnata la coppia di *primers* *Long/Short* sulle isoforme *Long* e *Short*.

in base al peso molecolare delle due isoforme, abbiamo ottenuto un amplificato di 842 bp per la *Long2* e di 412 bp per la *Short*: questo ci ha consentito di distinguerle e successivamente di isolarle. Le varianti *Long2* e *Short* sono state identificate mediante una reazione di PCR semiquantitativa, utilizzando RNA proveniente dal tessuto *testis* del pannello *RNA Ambion*[®]. La purificazione del DNA genomico è stata effettuata tramite il kit *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, che permette il dissolvimento del gel d'agarosio e promuove il legame del *double-stranded* DNA ad una matrice *fiber glass*. Il DNA così purificato è stato inviato al *service* di *sequencing* dell'*MWG*.

2.8 ANALISI WESTERN

2.8.1 VALIDAZIONE DI CHPF2 A LIVELLO PROTEICO

La variazione di espressione della proteina CHPF2 è stata valutata tramite analisi *Western*. Il tessuto placentare è stato scelto per valutare l'espressione della proteina codificata dal gene CHPF2. Dopo estrazione con RIPA Buffer, le proteine sono state quantificate attraverso il Qubit (Invitrogen). Masse equivalenti di lisato proteico del campione e del controllo negativo (proteine estratte dalle cellule di Neuroblastoma SK-N-BE) sono state caricate su gel di poliacrilammide al 10% (sistema *Hoefer miniVE*, Amersham Biosciences) e trasferite mediante *elettroblotting* su membrana di nitrocellulosa (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). L'efficienza di trasferimento è stata valutata mediante colorazione della membrana con rosso Ponceau. Dopo essere state bloccate con *blocking solution* al 5% per 1h a 20°C, le membrane sono state incubate a 4°C per 16h con l'Ab rabbit polyclonal IgG anti-CHPF2 1:250, diluito in TBST.

Per la sintesi di tale Ab, tramite *BLASTP* abbiamo ricercato le regioni comuni alle due isoforme (*Long2* e *Short*) partendo dalle sequenze aminoacidiche di ciascuna delle varianti trascrizionali, in modo tale da disegnare un peptide

sintetico all'interno di tale finestra. Sulla base di tale analisi sono stati disegnati i possibili epitopi utilizzati per la successiva sintesi del peptide immunogenico ed inviati alla *company* Primm Peptide Synthesis (peptides@primm.it). Le sequenze del peptide sintetico sono: *NH₂-EDPCVEAVGERGGPQ-COOH* e *NH₂-RARLDQSDEDFKPRIVP-COOH*. Successivamente, grazie alla collaborazione con la Dott.ssa Agata Zappalà, appartenente al gruppo di ricerca coordinato dal Prof. Federico Cicirata (Dipartimento di Scienze Bio-mediche, Università di Catania), il peptide sintetico è stato unito ad una molecola *carrier* per essere veicolato all'interno del circolo sanguigno di un coniglio; il sistema immunitario dell'animale riconosce come *non self* il peptide sintetico e dà luogo ad una risposta immunologica culminante con la produzione dell'anticorpo. Dopo quattro somministrazioni del peptide sintetico è stato praticato un salasso ed estratto l'anticorpo dal siero dell'animale. La proteina β -Actina, utilizzata come normalizzatore di massa, è stata acquistata presso la ditta SIGMA-ALDRICH. La densitometria è stata fatta utilizzando il software *ImageJ 1.41*.

2.9 ESPRESSIONE DEI miR-671-5p E -3p IN UN PANNELLO DI TESSUTI E ORGANI

Utilizzando 100 ng di RNA proveniente dal pannello di organi e tessuti RNA Ambion[®] è stata effettuata la retrotrascrizione utilizzando *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit* con *primers a stem-loop* specifici per i miRNA maturi, alle seguenti condizioni di reazione: 16°C, 30'; 42°C, 30'; 85°C, 5' (**Figura 25**). Successivamente 10 ng del cDNA ottenuto sono stati amplificati in un apparecchio *7900HT Fast Real-Time PCR System* (*Applied Biosystem, USA*) con *TaqMan MicroRNA Assay* e *TaqMan Gene Expression Master Mix* (*Applied Biosystem*).

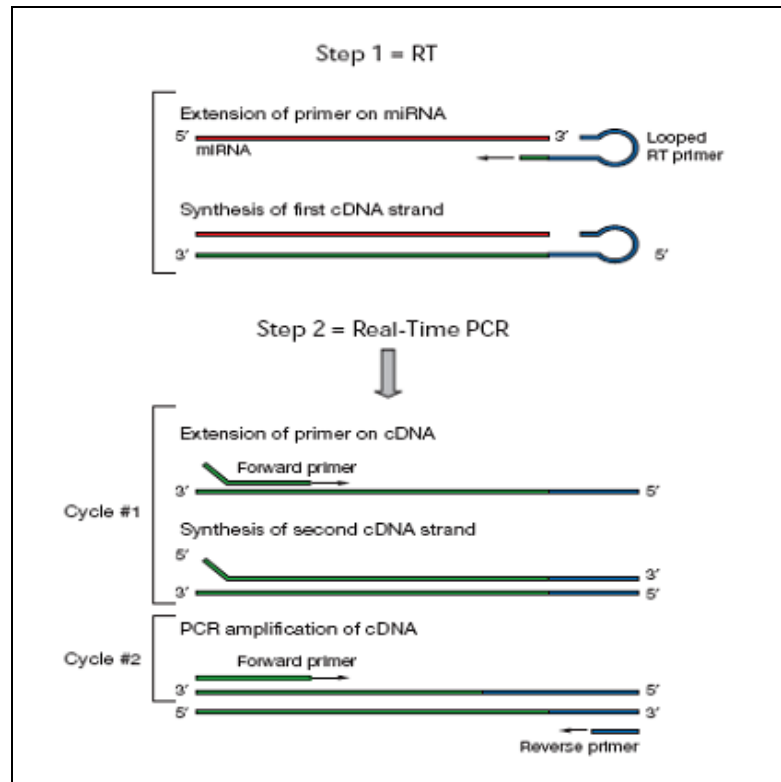


Figura 25. Reazione in due *steps* per la quantificazione dei *miRs* maturi.

2.10 PROCEDURA ANALITICA STATISTICA DEI DATI DI ESPRESSIONE GENICA DI CHPF2 E DEL MIR-671

I livelli di espressione di ogni gene sono stati analizzati secondo il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ attraverso *RQ Manager 1.2 software (Applied Biosystems)*: la normalizzazione dei dati è stata effettuata utilizzando HPRT, come controllo endogeno per il gene ospite CHPF2, e snRNA U6 per il miR-671: i loro rispettivi 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 (HPRT o U6) nel campione in analisi. Il ΔCt del

calibratore è invece il valore Ct del gene *target* e il valore di Ct del controllo endogeno (HPRT o U6) nel calibratore (cioè il controllo non trattato). I valori di Ct maggiori di 35 sono stati considerati uguali a 35, mentre i valori di Ct *undetermined* (indeterminato) sono stati considerati uguali a 40. Per identificare i geni differenzialmente espressi, abbiamo utilizzato un *fold change* stringente ($fc \leq 0.33$ per la *downregulation* e un $fc \geq 3$ per l'*upregulation*, equivalente ad un $\text{Log}_{10} = \pm 0.5$) al fine di considerare un gene come sovra- oppure sottoespresso. I dati di espressione sono stati visualizzati attraverso il *software MeV4.8.1*.

2.10.1 DATI DI ESPRESSIONE DEL miRNA E DEL GENE CHPF2

Per verificare se esistesse una relazione tra i valori d'espressione, ottenuti nel pannello di tessuti ed organi RNA Ambion[®], tra le due forme del miRNA maturo e le due varianti trascrizionali del gene ospite CHPF2, abbiamo interrogato il *software* Statistica (http://www.fon.hum.uva.nl/Service/Statistics/Correlation_coefficient.html). Effettuando tutte le possibili combinazioni tra le due forme mature del miRNA e le due varianti del gene ospite è stato possibile ricavare il valore di correlazione di *Pearson*, impostando un valore di p-value di 0.01 per la significatività dei nostri risultati.

2.11 PREDIZIONE DEI TARGETS ED ANALISI DELLE GENE ONTOLOGIES

Per aumentare la stringenza dei dati, i *targets* dei miR-671-5p e miR-671-3p sono stati analizzati usando una combinazione di differenti approcci. Uno di questi è stato l'utilizzo dei *database* miRecords (<http://mirecords.biolead.org/>) e Starbase (<http://starbase.sysu.edu.cn/>). Nell'analisi di predizione condotta con *miRecords* riguardante il miR-671-3p si è scelto di prendere in

considerazione solo i *targets* predetti da almeno 4 dei *tools* predittori presenti nel *database*; in quella riguardante il miR-671-5p, il filtro utilizzato per la selezione dei *targets* è stato di 5 *tools* predittori. Per quanto concerne *StarBase*, questo *tool* è stato scelto poiché si avvale di esperimenti di immunoprecipitazione con proteine Argonauta (*CLIP-seq*) per incrementare l'attendibilità delle predizioni stesse. Nel caso dei *targets* predetti per il miR-671-5p è stato possibile selezionare dei geni che risultassero anticorrelati con il miRNA in oggetto, sia in tessuti fisiologici che patologici. Per questo abbiamo fatto uso di: (1) *Affymetrix HT Human Genome U133 Array Plate Set*, contenente l'espressione di 12.042 geni in 243 campioni di tessuto tumorale e in 10 di tessuto normale; (2) *Agilent 8 x 15 K Human miRNA-specific microarrays*, contenente il *profiling* di espressione di 534 *miRNAs* inclusi 470 *miRNAs* umani in 240 campioni di tessuto tumorale e in 10 di tessuto normale. Entrambe le piattaforme sono state ottenute dal TCGA data portal (The Cancer Genome Atlas Project, <http://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/dataAccessMatrix.htm>). 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-value*<0.05, tramite IFA Service (http://www.fon.hum.uva.nl/Service/Statistics/Correlation_coefficient.html). Inoltre abbiamo ricavato un ulteriore set di *targets* dal lavoro di Ben-Moshe [114]. 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>): questo approccio ci ha consentito di focalizzare la nostra attenzione su quei mRNA specificamente coinvolti nei processi biologici relativi al tumore e in particolare al Glioblastoma Multiforme.

2.12 IPOTETICO *TARGETING* DEL miRNA NEI CONFRONTI DEL GENE OSPITE CHPF2: PREDIZIONE CON IL *TOOL* RNA22

Data la sua peculiare posizione genomica all'interno del gene ospite, abbiamo interrogato il *tool* di predizione RNA22 (<http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22.html>) per verificare a livello computazionale un possibile *targeting* da parte del miRNA. Questo *tool* ci ha consentito di immettere le sequenze, in formato *FASTA*, sia del cDNA del quarto esone del gene CHPF2 (compresa la regione del 3'UTR), che del miR-671-5p e miR-671-3p, per ricercare segmenti dei trascritti di CHPF2 che fossero potenziali bersagli del miR-671 sia nella regione del 3'UTR (*targeting* classico) che a livello della *coding sequence*.

2.13 IDENTIFICAZIONE *IN SILICO* DEI SITI DI LEGAME DI FATTORI DI TRASCRIZIONE (*TFBSs*)

Le regioni genomiche conservate (70% di identità in almeno 100 bp) tra *Homo sapiens* e *Mus musculus* in una finestra di 20 Kbp (10 Kbp a monte e 10 Kbp a valle del sito di inizio della trascrizione o *TSS*), contenenti segnali *TFBSs* ed i rispettivi fattori di trascrizione (TF), sono stati ricavati per l'hsa-premiR-671 dal database *ECRbase* (<http://ecrbase.dcode.org/>). La predizione dei TF è stata interpolata con i dati statisticamente significativi di correlazione (positiva o negativa) tra i TF del miRNA e dei suoi rispettivi *targets*, usando Multi Experiment Matrix (<http://biit.cs.ut.ee/mem>).

2.14 ANALISI DELLE *NETWORKS*

Le *networks* biologiche dei geni *target* dei miR-671-5p e miR-671-3p sono state costruite recuperando i corrispondenti dati di interattoma attraverso il plug-in Cytoscape NCBI Entrez EUtilities Web Service Client (www.pathwaycommons.org/pc/cytoscape.do). 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>).

2.15 ANALISI DELLA REGIONE 7q36.1: APPROCCIO DEL GENE CANDIDATO

Il gene *CHPF2* è localizzato nella regione cromosomica 7q36.1, che è soggetta ad alterazioni strutturali in cellule di GBM e di altre neoplasie (e.g., Medullary Thyroid Carcinoma, Barrett's Esophagus, Gastric carcinoma). I *database* utilizzati per la ricerca di alterazioni cromosomiche a livello della regione 7q36.1 sono stati *Progenetix Database* (<http://www.progenetix.net/progenetix>) e *UCSC Cancer Genomics Browser* (<https://genome-cancer.soe.ucsc.edu/>), grazie ai quali è stato possibile ottenere informazioni riguardanti sia la regione cromosomica di nostro interesse (*chr7: 150929585..150935905*) che i riarrangiamenti relativi a *CHPF2* in diversi modelli tumorali: questi dati provengono da esperimenti di *Comparative Genomic Hybridization (CGH)*. Altre informazioni relative al coinvolgimento della regione q36.1 del cromosoma 7 in diversi tumori solidi sono state ottenute dalla letteratura.

2.16 PROFILING DELL'ESPRESSIONE DI *CHPF2* E DEI miR-671-5p E miR-671-3p IN BIOPSIE PARAFFINATE DI GLIOBLASTOMA MULTIFORME

Tramite tecnologia *Taq-Man*, abbiamo studiato il profilo d'espressione di *CHPF2* e dei miR-671-5p e miR-671-3p in una coorte di ventinove biopsie fissate in formalina e incluse in paraffina (FFPE, Formalin-Fixed Paraffin-Embedded) di Glioblastoma umano di grado IV (GBM), gentilmente concesse dall'Unità di Anatomia Patologica dell'Azienda Policlinico dell'Università di Catania. Il controllo preso in riferimento per tale sistema sperimentale è stato Parenchima Cerebrale fetale. Per l'isolamento dell'RNA sono state ottenute

fettine dello spessore di 20 μ m. L'RNA totale dei campioni FFPE è stato estratto mediante l'utilizzo del kit *RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit* (Ambion, Applied Biosciences, Austin, TX), secondo il protocollo fornito dal kit. 1 μ g di RNA totale proveniente da tutte le biopsie paraffinate e dai rispettivi controlli è stato retrotrascritto in cDNA, utilizzando il kit *RT High Capacity RNA to cDNA* (Applied Biosystems). Il gene *housekeeping* utilizzato come controllo endogeno è stato HPRT. A questo punto, 50 ng di cDNA di ciascun campione miscelati con *Taq Man Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems) sono stati utilizzati per effettuare l'analisi quantitativa mediante *Real Time PCR* con *Sonde TaqMan* specifiche in 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Per il *profiling* d'espressione dei miR-671-5p e miR-671-3p è stata utilizzata la stessa procedura effettuata nel pannello di tessuti e organi, descritta precedentemente.

2.17 MODULAZIONE IN VITRO DELL'ESPRESSIONE DEI miR-671-5p e miR-671-3p

Abbiamo seminato 6×10^4 o 3.6×10^5 cellule U87MG per *well* per ottenere RNA e proteine, rispettivamente; le abbiamo quindi trasfettate con 30 nM di pre-miR-671-5p e pre-miR-671-3p e relativo controllo e con 60 nM di anti-miR-671-5p e anti-miR-671-3p e relativo controllo. Gli esperimenti di trasfezione sono stati condotti usando il protocollo di trasfezione *siPORT NeoFX Transfection Agent* (Ambion), secondo il protocollo fornito dal kit. L'RNA totale dalle linee è stato estratto a 24 e 48 h dopo la trasfezione mediante *TriZol*[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), secondo il protocollo fornito dal kit. L'RNA così ottenuto è stato utilizzato sia per confermare l'efficienza di trasfezione (>82%) che per analizzare mediante *Real-time PCR* l'espressione delle varianti *Long2* e *Monoexonic* del gene ospite CHPF2 e di alcuni *targets* predetti dei miR-671-5p e miR-671-3p, selezionati sulla base del loro coinvolgimento nel controllo della proliferazione e differenziamento cellulare e nel GBM in particolare. La variazione di espressione della proteina CHPF2 è

stata valutata anche tramite analisi *Western*. Masse equivalenti di lisato proteico dei trasfettati e dei rispettivi controlli, a 24 e 48 h, sono state caricate su gel di poliacrilammide (sistema *Hoefer miniVE*, Amersham Biosciences) al 10% e trasferite mediante *elettroblotting* su membrana di nitrocellulosa (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). Per le fasi successive del *Western*, fare riferimento alla sezione “Validazione a livello proteico di CHPF2”.

3. RISULTATI

Uno degli obiettivi della nostra ricerca è stato verificare la correlazione tra l'espressione del miRNA maturo e quella del gene ospite CHPF2, in modo tale da poter formulare delle ipotesi sugli effetti che questa correlazione potrebbe avere sia a livello fisiologico che patologico.

Sia il miR-671 che il gene ospite sono localizzati nella regione 7q36.1, che è frequentemente alterata nel Glioblastoma Multiforme (GBM), un tumore solido che coinvolge le cellule gliali. Per questo motivo, abbiamo voluto verificare un possibile ruolo del miRNA 671 nella patogenesi del GBM.

GENOMICA

3.1 SOVRAPPOSIZIONE DEL miR-671 AL TRATTO CODIFICANTE DEL GENE OSPITE CHPF2

Lo studio dell'organizzazione genomica rivela che il miR-671 (*accession number* MI0003760) è sovrapposto al tratto codificante del gene di 2° classe *Chondroitin-Sulfate-Glucuronyltransferase* (CHPF2), localizzato sul cromosoma 7. La sequenza annotata nel *database* Gene di NCBI per tale gene è lunga 3973 bp (chr. 7q36.1, nt 150929585-150935905); il *premiR-671* (lungo 118 nucleotidi) si estende dalla posizione 3572 alla 3690, all'interno della porzione codificante del quarto esone di questa variante trascrizionale. Le coordinate genomiche del *premiR-671* sono reperibili su *miRBase* (chr. 7q36.1, nt. 150935507-150935624, strand+) e fanno riferimento alla sequenza del genoma umano (Assembly GRCh37) depositata su ENSEMBL.

3.2 ANALISI EVOLUTIVA DEL GENE OSPITE CHPF2 E DEL GENE miR-671

L'analisi effettuata, tramite BLASTN, per la ricerca delle sequenze omologhe del gene CHPF2, ha evidenziato che quest'ultimo risulta essere un gene mammifero-specifico, come mostrato nella **Tabella 4** sottostante:

Tabella 4. Risultato dell'allineamento tra il DNA di CHPF2 in *Homo sapiens* e il DNA di CHPF2 delle specie elencate.

<i>SPECIE</i>	<i>POSIZIONE CROMOSOMICA</i>	<i>SCORE</i>	<i>IDENTITA' %</i>	<i>NUCLEOTIDE bp</i>
Homo sapiens	chromosome 7: 150929585-150935905	1.17E+04	100%	
Rattus norvegicus	chromosome 4: c5965385-5959923	1615	1248/1426 (88%)	From 4773 To 6184
		809	569/633 (90%)	From 2516 To 3145
		298	213/237 (90%)	From 3867 To 4099
Mus musculus	chromosome 5: 24092568-24098305	1583	1320/1536 (86%)	From 4802 To 6321
		819	557/613 (91%)	From 2535 To 3145
		451	365/422 (86%)	From 1395 To 1812
		307	214/236 (91%)	From 3867 To 4098
Canis lupus familiaris	chromosome 16: 15274980-15279166	1879	1785/2140 (83%)	From 4224 To 6321
		889	595/651 (91%)	From 2496 To 3145
		368	261/291 (90%)	From 1514 To 1802
		300	229/260 (88%)	From 3844 To 4098
Loxodonta africana	59833512-59837670	1676	1235/1394 (89%)	From 4798 To 6183
		907	976/1200 (81%)	From 2461 To 3618
		346	263/299 (88%)	From 1514 To 1810
		344	259/294 (88%)	From 3836 To 4125
Bos taurus	chromosome 4: 114610856-114615302	1531	1167/1330 (88%)	From 4862 To 6183
		929	749/865 (87%)	From 2295 To 3145
		392	443/549 (81%)	From 1461 To 1986
Sus scrofa	chromosome 18: c62911171-6286384	1816	1315/1475 (89%)	From 4863 To 6321
		835	609/684 (89%)	From 2458 To 3130
		390	388/472 (82%)	From 1508 To 1975
		311	252/292 (86%)	From 3811 To 4098
Pongo Tobellii	chromosome 7: 148904142-148926432	1.07E+04	6158/6336 (97%)	From 1 To 6321
		5559	3722/4051 (92%)	From 2293 To 6320
		254	243/294 (83%)	From 1992 To 2283
		220	230/283 (81%)	From 1996 To 2274
Oryctolagus cuniculus	chromosome 13: 12642766-12647034	1687	1187/1320 (90%)	From 4872 To 6183
		758	544/610 (89%)	From 2531 To 3139
		324	240/272 (88%)	From 1514 To 1784
Ornithorhynchus anatinus	14791628-14787813	196	227/283 (80%)	From 1514 To 1784
Equus caballus	chromosome 4: 102824253-102828923	2276	2141/2551 (84%)	From 3828 To 6321
		1075	784/878 (89%)	From 2296 To 3157
		603	561/670 (84%)	From 1331 To 1986
Monodelphis domestica	chromosome 8: 215880086-215884902	623	512/596 (86%)	From 2536 To 3125
Pan troglodytes	chromosome 7: 151768418-151775981	1.13E+04	6266/6329 (99%)	From 1 To 6321
Danio rerio	chromosome 7: 44151045-44162653	/	/	/
Gallus gallus	chromosome 2: 122159-126456	/	/	/
Xenopus (Silurana) tropicalis	unknown	/	/	/
Oreochromis niloticus	unknown	/	/	/
Meleagris gallopavo	unknown	/	/	/
Callithrix jacchus	chromosome 8: 95562808-95567348	/	/	/

Inoltre, l'allineamento tra la sequenza di DNA di CHPF2 contro tutto il genomico di *Homo sapiens*, ha dato esito negativo per la ricerca di paraloghi di CHPF2; il *BLASTP* effettuato tra la proteina CHPF2, attualmente annotata su Gene, contro tutto il *refseq-protein* di *Homo sapiens* fornitoci dal *database*

conferma che questo gene fa parte della famiglia delle *Chondroitin Synthase*, come annotato in letteratura [64] e come mostrato nella **Tabella 5**.

Tabella 5. Risultato dell'allineamento tra la sequenza in formato FASTA della proteina CHPF2 in *Homo sapiens* e il *refseq-protein* ricavato dal *database* BLAST.

ACCESSION	PROTEIN NAME	SCORE	IDENTITA' %
NP_061888.1	chondroitin sulfate glucuronyltransferase precursor (CHPF2)	1560	100%
NP_078812.2	chondroitin sulfate synthase 2 isoform 1 (CHPF)	801	56%
NP_001182660.1	chondroitin sulfate synthase 2 isoform 2 (CHPF)	683	60%
NP_055733.2	chondroitin sulfate synthase 1 precursor (CHSY1)	184	25%
NP_787052.3	chondroitin sulfate synthase 3 (CHSY3)	180	24%
NP_064541.1	glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransferase (C1GALT1)	68.2	28%
NP_061060.3	chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 2 (CSGALNACT2)	61.2	23%
NP_001123990.1	chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 1 (CSGALNACT1)	58.5	21%
NP_002908.1	beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase radical fringe precursor (RFNG)	40.8	28%
NP_001159815.1	beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase manic fringe isoform 2 (MFNG)	36.6	26%
NP_002396.2	beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase manic fringe isoform 1 (MFNG)	36.2	29%
NP_001094800.1	C1GALT1-specific chaperone 1-like (LOC728819)	33.5	27%
NP_001723.2	butyrophilin subfamily 1 member A1 precursor (BTN1A1)	32	30%
NP_000296.2	serum paraoxonase/arylesterase 2 isoform 1 (PON2)	31.6	36%
NP_001018171.1	serum paraoxonase/arylesterase 2 isoform 2 (PON2)	31.6	36%
NP_919299.3	beta-1,3-glucosyltransferase precursor (B3GALT1)	32	27%
NP_002295.1	beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase lunatic fringe isoform d (LFNG)	30.8	28%
NP_001035257.1	beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase lunatic fringe isoform a (LFNG)	30.4	28%
NP_001035258.1	beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase lunatic fringe isoform b preproprotein (LFNG)	30.4	28%
NP_001159827.1	beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase lunatic fringe isoform c (LFNG)	30	27%
NP_001122080.1	mitogen-activated protein kinase-binding protein 1 isoform b (MAPKBP1)	27.7	48%
NP_055809.2	mitogen-activated protein kinase-binding protein 1 isoform a (MAPKBP1)	27.7	48%
NP_001094348.1	putative uncharacterized protein C8orf73 (C8orf73)	26.6	33%
NP_694997.2	echinoderm microtubule-associated protein-like 3 (EML3)	26.6	58%
NP_775864.3	N-acetyl-beta-glucosaminyl-glycoprotein 4-beta-N-acetylgalactosaminyltransferase 2 (B4GALNT3)	26.6	42%

La ricerca di geni paraloghi del pre-miR-671 sia all'interno degli altri membri della famiglia *Chondroitin N-acetylgalactosaminyltransferase* che in altre localizzazioni genomiche ha dato esito negativo e ciò sta a significare che il miR-671 si trova in singola copia nel nostro genoma (**Tabella 6**).

Tabella 6 Risultato dell'allineamento tra la sequenza, in formato *FASTA* del premiR-671 ed il DNA genomico di CHPF2 nelle diverse specie.

<i>SPECIE</i>	<i>POSIZIONI CROMOSOMICHE</i>	<i>SCORE</i>	<i>IDENTITA' %</i>
Homo sapiens	150929585-150935905	219	100%
Rattus norvegicus	5965385-5959923	204	99%
Mus musculus	24092568-24098305	202	99%
Canis lupus familiaris	15274980-15279166	202	98%
Loxodonta africana	59833512-59837670	207	99%
Bos taurus	114610856-114615302	185	97%
Sus scrofa	6291171-6286384	196	97%
Pongo abelii	148904142-148926432	219	100%
Oryctolagus cuniculus	12642766-12647034	206	99%
Equus caballus	102824253-102828923	196	98%
Pan troglodytes	151768418-151775981	219	100%
Bos taurus	118099984-118105512	185	97%
Ornithorhynchus anatinus	/	/	/
Monodelphis domestica	/	/	/
Danio rerio	/	/	/
Gallus gallus	/	/	/
Xenopus (Silurana) tropicalis	/	/	/
Oreochromis niloticus	/	/	/
Meleagris gallopavo	/	/	/
Callithrix jacchus	/	/	/

La ricerca di geni ortologhi all'hsa-premiR-671 ha confermato invece i risultati di Heimberg [12] secondo cui il miR-671 è mammifero-specifico.

3.3 ANALISI DELLE *EXPRESSED SEQUENCE TAGs (ESTs)* E IDENTIFICAZIONE DI QUATTRO ISOFORME TRASCRIZIONALI DI *CHPF2*

Uno dei primi obiettivi che ci siamo posti è stato quello di verificare l'eventuale presenza di altre varianti trascrizionali del gene ospite, che codificassero per una proteina matura priva della sequenza del *premiR-671* e l'esistenza di una eventuale variazione nel livello d'espressione delle diverse isoforme a livello di una cellula o di un tessuto.

Grazie all'utilizzo dei *tools* bioinformatici *ESTannotator* e *Spidey* siamo riusciti a ricostruire la sequenza esone/introne di quattro varianti trascrizionali del gene *CHPF2*, mostrate in **Figura 26**. La prima isoforma, lunga 2711 bp, contiene il *premiR-671* a livello del quinto esone; la quarta isoforma, lunga 4667 bp, è quella annotata sul *database Gene* e contiene il *premiR-671* all'interno del quarto esone. Queste due varianti sono identiche in sequenza, tranne nella regione N-terminale, più corta nella isoforma 1, e nell'estremità 3', anche questa più corta a causa probabilmente della non completa caratterizzazione della sua regione 3'*UTR*. Presumibilmente le due varianti trascrizionali *Long1* e *Long2* derivano da un fenomeno di *splicing* per "ritenzione intronica". L'mRNA della seconda isoforma, lunga 2730 bp e costituita da un unico esone, non contiene il *premiR-671* e la terza isoforma, di 2534 bp, lo contiene a livello del quarto introne. Nel corso della nostra ricerca le varianti trascrizionali sono state definite come *Long1*, *Monoexonic*, *Short* e *Long2* rispettivamente.

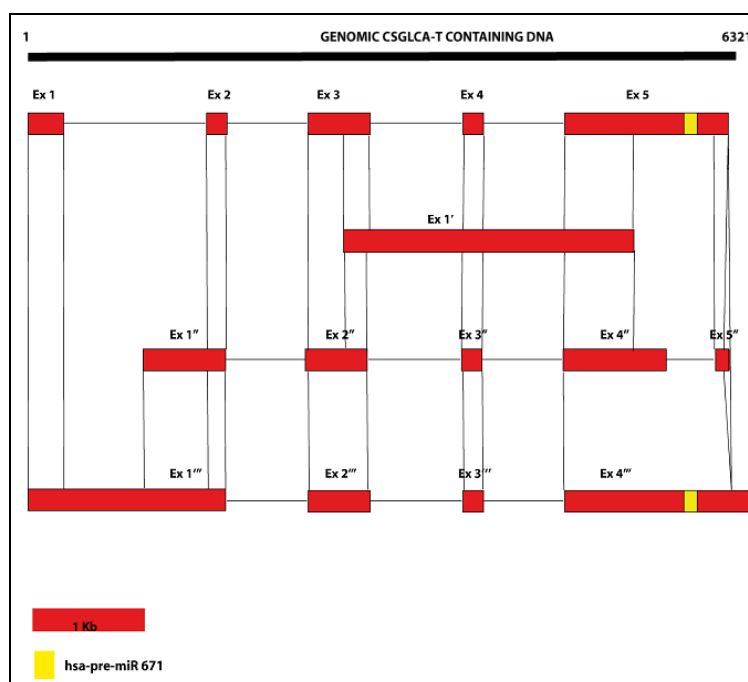


Figura 26. Isoforme del gene CHPF2 ottenute grazie all'assemblaggio delle EST. In rosso sono rappresentate le sequenze codificanti, in giallo il *premiR-671*, mentre gli introni sono rappresentati da una linea tratteggiata. Dall'alto in basso sono rappresentate le varianti trascrizionali da noi definite: *Long1*, *Monoexonic*, *Short* e *Long2*.

3.4 ESPRESSIONE DELLE ISOFORME DEL GENE CHPF2 SINTETIZZATE IN DIVERSI TESSUTI ED ORGANI

Al fine di verificare l'andamento d'espressione sia della variante trascrizionale di CHPF2 attualmente annotata sul *database Gene* (isoforma *Long2*) che della variante *Monoexonic* da noi identificata tramite l'assemblaggio delle *EST*, abbiamo effettuato, tramite l'uso di sonde *TaqMan*, un esperimento di quantificazione relativa mediante Real-Time PCR su un pannello di diciannove organi e tessuti umani RNA Ambion® (*adipose, bladder, brain, cervix, colon, esophagus, heart, kidney, lung, ovary, placenta, prostate, sk.muscle, sm.intestine, spleen, testes, thymus, thyroid, trachea*). I valori d'espressione sono stati normalizzati utilizzando il metodo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$, usando come calibratore *prostate* e come *housekeeping* HPRT per l'analisi delle varianti di

splicing. I risultati di tale esperimento sono mostrati nella **Figura 27** e **Grafico 1**:

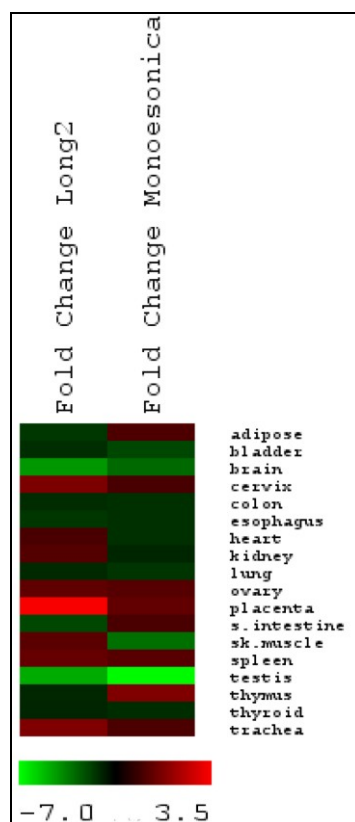


Figura 27. Valori di *Fold Change* delle varianti *Long2* e *Monoexonic* nel pannello di 19 tessuti ed organi RNA Ambion®. Prostata è il tessuto utilizzato come calibratore nell'analisi in Real-Time PCR. La *colour scale* indica i relativi livelli di espressione delle due varianti. Il *bar code* alla base rappresenta la *colour scale* dei *Fold Change* dei valori.

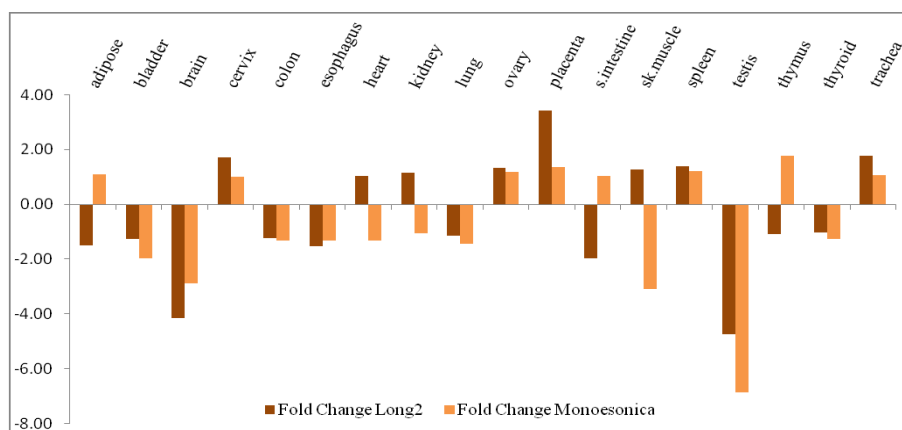


Grafico 1. Valori di *Fold Change* delle varianti *Long2* e *Monoexonic* nel pannello di 19 tessuti ed organi RNA Ambion®. Prostata è il tessuto utilizzato come calibratore nell'analisi in Real-Time PCR.

Quest'esperimento, oltre a mettere in relazione due delle quattro varianti da noi identificate tramite l'assemblaggio delle EST, ci ha consentito di validare per la prima volta in Real-Time PCR la variante *Monoexonic*, non identificata in letteratura né a livello computazionale né sperimentale. Per quanto riguarda l'isoforma *Short* (contenente il miRNA a livello del quarto introne), anch'essa è stata validata sperimentalmente in PCR semiquantitativa su *testis*, come mostrato nella **Figura 28** sottostante

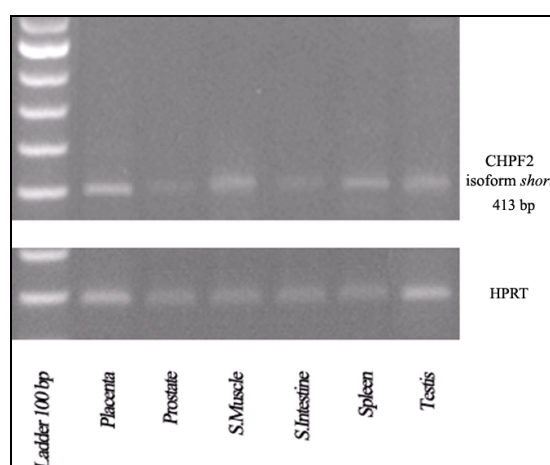


Figura 28. Separazione su gel elettroforetico della variante trascrizionale *Short*.

La sequenza ottenuta tramite il *service di sequencing dell'MWG* è stata paragonata mediante Blast con quella che noi abbiamo ottenuto dalle precedenti analisi sulle EST, ottenendo una conferma della sua validazione.

3.5 VALIDAZIONE DI CHPF2 A LIVELLO PROTEICO

Per la immuno-rilevazione delle isoforme *Long2* e *Short* è stato scelto il tessuto placentare: sia secondo i dati forniti dalla letteratura [63], che secondo i risultati da noi ottenuti sul pannello di organi e tessuti da noi analizzato, questo è il tessuto in cui ci si attende il livello d'espressione massimo della proteina. In **Figura 29** è mostrato il risultato ottenuto.

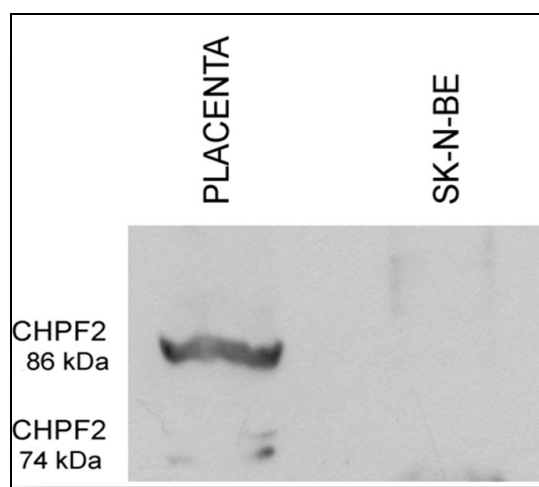


Figura 29. Validazione dell'isoforma *Long2* e *Short* a livello proteico in placenta ed in SK-N-BE controllo negativo.

Quest'esperimento ci ha permesso di confermare, a livello proteico, la presenza della forma *Long2* e di validare la forma *Short*.

3.6 ESPRESSIONE DEI miR-671-5p E -3p IN UN PANNELLO DI TESSUTI E ORGANI

Al fine di paragonarne l'andamento d'espressione con il gene ospite ed eventualmente ipotizzare delle correlazioni, tramite l'uso di sonde TaqMan, abbiamo verificato l'espressione dei miR-671-5p e miR-671-3p umani maturi nello stesso pannello di tessuti utilizzati per l'analisi dell'espressione di CHPF2. Anche in questo caso abbiamo normalizzato i valori d'espressione rispetto alla *prostata*. I risultati di tale esperimento sono mostrati nella **Figura 30**.

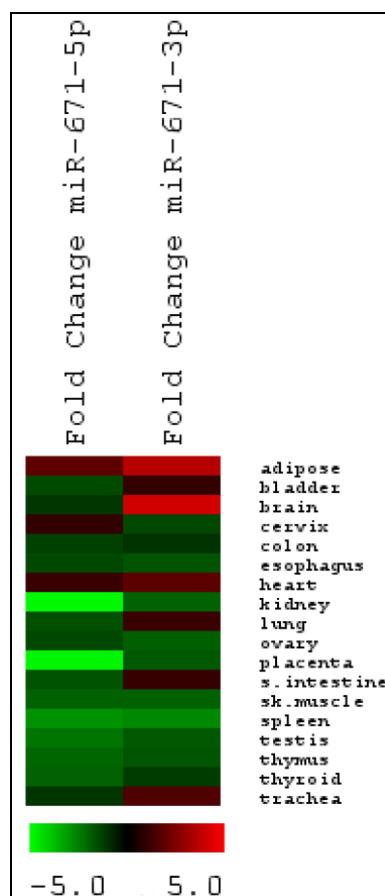


Figura 30. Valori di *Fold Change* delle due forme mature del miR-671 nel pannello di 19 tessuti ed organi RNA Ambion®. Prostata è il tessuto utilizzato come calibratore nell'analisi in Real-Time PCR. La *colour scale* indica i relativi livelli di espressione delle due forme mature del miR-671. Il *bar code* alla base rappresenta la *colour scale* dei *Fold Change* dei valori.

3.7 ANALISI STATISTICA DEI DATI DI ESPRESSIONE GENICA

Al fine di poter evidenziare una correlazione d'espressione tra le due forme mature del miRNA e le due varianti trascrizionali del gene ospite CHPF2, nel pannello di tessuti ed organi RNA Ambion[®], abbiamo consultato il programma *Statistica* per effettuare un test di correlazione di *Pearson*. I valori di coefficiente di correlazione *r* ottenuti sono elencati nella **Tabella 7**, sottostante:

Tabella 7. Valori di coefficiente di correlazione *r* tra le due forme mature del miR-671 e le isoforme *Long2* e *Monoesonica* di CHPF2 nel pannello di 19 tessuti Ambion.

	P value < 0.01	
	hsa-miR-671-5p	hsa-miR-671-3p
<i>Long2</i>	-0.28	-0.37
<i>Monoesonica</i>	0.01	-0.16

Da questi dati emerge dunque che non si può parlare di un'effettiva anticorrelazione di espressione tra le due forme mature del miRNA e le due varianti trascrizionali del gene ospite CHPF2; tuttavia il valore maggiormente significativo è stato riscontrato nella coppia di dati miR-671-3p / *Long2* (-0.37).

3.8 ANALISI DEI *TARGETS* E DELLE *GENE ONTOLOGIES*

Mediante analisi computazionale, abbiamo individuato i *targets* dei miR-671-5p e miR-671-3p. Rispettivamente per il miR-671-5p sono stati trovati 73 *targets* (1 validato sperimentalmente e 72 predetti). Tutti i *targets* predetti, selezionati per le analisi successive, hanno coefficiente di *Pearson* negativo

nell'analisi di correlazione con i miRNA ($p < 0.05$). Analizzandoli, abbiamo trovato che il 22% è coinvolto nel GBM (**Tabella 8**).

Tabella 8 Lista dei *targets* predetti o validati del miR-671-5p coinvolti nel GBM.

<i>TARGET</i>	<i>miRNA</i>	<i>PREDIZIONE</i>	<i>FUNZIONE BIOLOGICA</i>	<i>REFERENZE</i>
ADAMTS1	miR-671-5p	Anticorrelazione; Algoritmo CoSMic	regulation of cell proliferation; signaling pathway	PMID: 16133547
CCNA1		Anticorrelazione; Algoritmo CoSMic	cell cycle	PMID: 216086
EDN1		Validato	cell differentiation; regulation of cell proliferation; negative signaling pathway; regulation of cell cycle; regulation of MAPKKK cascade; regulation of cell migration	PMID: 22013079
FGFR2		Anticorrelazione; Structural prediction (5)	regulation of cell proliferation; signaling pathway	PMID: 14756442 PMID: 15696966
FOSB		Anticorrelazione; Algoritmo CoSMic	regulation of transcription; signaling pathway; regulation of MAPKKK cascade	PMID: 22829753
GPM6A		Anticorrelazione; Structural prediction (5)	cell differentiation	PMID: 18522499
HBEGF		Anticorrelazione; Algoritmo CoSMic	regulation of cell communication; signaling pathway; regulation of growth; regulation of cell migration	PMID: 924565
IL1B		Anticorrelazione; Algoritmo CoSMic	regulation of transcription; regulation of cell proliferation; regulation of apoptosis; signaling pathway	PMID: 22330721
KRAS		Anticorrelazione; ClipSeq (8)	regulation of transcription; cell differentiation; regulation of cell proliferation; regulation of apoptosis; signaling pathway	PMID: 19435821 PMID: 15517309 PMID: 16166301
MITF		Anticorrelazione; Algoritmo CoSMic	regulation of transcription; cell differentiation; regulation of cell proliferation; regulation of apoptosis; signaling pathway	PMID: 21525872
NDE1		Anticorrelazione; ClipSeq (2)	cell differentiation; nervous system development; cell cycle; neurogenesis; regulation of cell proliferation; cell migration	PMID: 15473967
NEDD9		Anticorrelazione; Algoritmo CoSMic	regulation of cell migration	PMID: 22869051
PIK3C2B		Anticorrelazione; Algoritmo CoSMic	signaling pathway; regulation of cell communication	PMID: 19609742
SATB2		Anticorrelazione; ClipSeq (24); Structural prediction (21)	regulation of transcription; cell differentiation; nervous system development; neurogenesis; regulation of cell migration	PMID: 15733084 PMID: 18333962
SHC3		Anticorrelazione; Structural prediction (5)	signaling pathway; nervous system development; signal transduction; signal transduction; cell communication	PMID: 15870690
SLC1A2		Anticorrelazione; Structural prediction (5)	signal transduction; regulation of cell communication	PMID: 18923405

I *targets* trovati per il miR-671-3p sono stati 25 predetti. Di questi ultimi sei geni hanno un ruolo importante nel GBM, come mostrato nella **Tabella 9** sottostante.

Tabella 9. Lista dei *targets* predetti del miR-671-3p coinvolti nel GBM.

<i>TARGET</i>	<i>miRNA</i>	<i>PREDIZIONE</i>	<i>FUNZIONE BIOLOGICA</i>	<i>REFERENZE</i>
GRB10	miR-671-3p	Structural prediction (4)	signaling pathway; signal transduction; regulation of cell communication	PMID: 19304958
IGF1R		ClipSeq (2)	regulation of cell proliferation; cell differentiation; regulation of apoptosis; nervous system development; signaling pathway	PMID: 17259557 PMID: 19714501
MLL2		ClipSeq (3)	regulation of transcription; regulation of cell proliferation	PMID: 10637508
PIP5K1A		ClipSeq (7)	signal transduction; signal transmission; signal transduction; cell migration	PMID: 19273547
RASGRF1		Structural prediction (4)	cell differentiation; regulation of apoptosis; nervous system development; neurogenesis	PMID: 18474104
SIN3A		Structural prediction (4)	regulation of transcription; regulation of apoptosis; regulation of cell cycle	PMID: 15548375

L'analisi delle *Gene Ontologies* (GO) ha mostrato che i *targets* di entrambi i miRNA sono implicati nel controllo della trascrizione, della proliferazione cellulare, del differenziamento, dell'apoptosi e del ciclo cellulare e dello sviluppo del Sistema Nervoso come mostrato nella **Figura 31** sottostante.

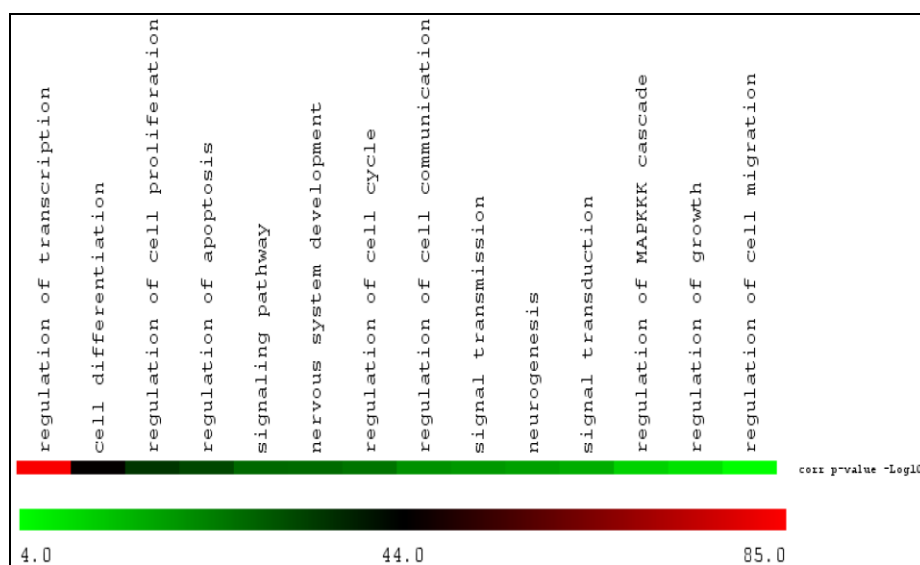


Figura 31. GO maggiormente sovra-espressa nella *networks* dei miR-671-5p e miR-671-3p. I valori dei *p-values* per ogni GO sono mostrati come $-\text{Log}_{10}$.

3.9 IPOTESI DEL *TARGETING* DEL miRNA SUL GENE OSPITE *CHPF2*: PREDIZIONE CON IL *TOOL RNA22*

Data la peculiare posizione genomica di tale miRNA e dati i risultati sperimentali ottenuti sul pannello RNA Ambion[®], la nostra ipotesi è che il gene ospite *CHPF2* (variante *Long2*) possa essere un potenziale *target* del miRNA ed il *targeting* potrebbe avvenire non attraverso il classico *binding site* al 3'UTR dell'mRNA ma attraverso l'interazione con la *coding sequence*. Questa ipotesi del *targeting* del miR-671-3p e miR671-5p sulla *coding sequence* dell'isoforma *Long2* sembra essere avvalorata dai risultati ottenuti tramite la predizione con il database RNA22. Infatti come si evince dalle **Figure 32 e 33**, l'hsa-miR-671-5p ha come *target* solo una regione (*Folding energy* = -29.500000 Kcal/mol), all'interno della *coding sequence* mentre l'hsa-miR-671-3p ha come *target* tre regioni all'interno della *coding sequence* e in particolare, tra queste, la regione dove è localizzato l'hsa-miR-671-5p (*Folding energy* = -40.099998 Kcal/mol). In particolare nella **Figura 34** sono rappresentate le regioni di *targeting* di entrambi i miRNA.

hsa-miR-671-5p

Targets predicted in gi|224589819:150934460-150935905 Homo sapiens chromosome 7, GRCh37.p5 Primary Assembly for hsa-miR-671-5p)

From offset 742 to 764 | Folding energy = -29.500000 Kcal/mol

```

5'<-- target -->3'      -linker-      5'<-- microRNA -->3'
CCTGTGGACACTCTCTTCCT GCGGGACGC AGGAAGCCCUGGAGGGCUGGAG
.((.(((...(((((.(((( ----- )))))...)))))..))..))
CCTGTGGACACTCTCTT--CTTCCT
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
-GAGGUCG--GGGAGGUCCGAAGGA

```

Figura 32. Particolare del *tool* RNA22: regione di *targeting* del miR-671-5p sulla *coding sequence* della variante *Long2*.

hsa-miR-671-3p

Targets predicted in gi 224589819:150934460-150935905 Homo sapiens chromosome 7, GRCh37.p5 Primary Assembly for hsa-miR-671-3p)	
From offset 1077 to 1097 Folding energy = -40.099998 Kcal/mol	<pre> 5'<-- target -->3' -linker- 5'<-- microRNA -->3' GGAAGCCCTGGAGGGGCTGGA GCGGGACGC UCCGGUUCUCAGGGCUCCACC (((.(((((.(((((((-----)))))))))))))... ---GGAAGCCCTGGAGGGGCTGGA CCACCU-CGGGAC--UCUUGCCU </pre>
From offset 90 to 110 Folding energy = -31.400000 Kcal/mol	<pre> 5'<-- target -->3' -linker- 5'<-- microRNA -->3' CTCTCGCTTTGAGGTGCTGGG GCGGGACGC UCCGGUUCUCAGGGCUCCACC(((((((.(((((((-----)))))))))))))..... CTCTC-GCTTTGAGGTGCTGGG CCACCUCGGGACUCU-UGGCCU </pre>
From offset 1248 to 1268 Folding energy = -30.900000 Kcal/mol	<pre> 5'<-- target -->3' -linker- 5'<-- microRNA -->3' AGGGGGCCGTGCCAGCTGGC GCGGGACGC UCCGGUUCUCAGGGCUCCACC ..(((((((.(((((((.-----.)))))))..))..)))))... AG-GGGGCCGTGCCAGCTGGC CCACCUCGGGACUC-UUGGCCU </pre>

Figura 33. Particolare del *tool* RNA22: regioni di *targeting* del miR-671-3p sulla *coding sequence* della variante *Long2*.



Figura 34. A) Sequenze dell'hsa-premiR-671 e dei miR-671-5p e miR-671-3p ricavate da miRBase; B) Particolare dell'allineamento: il premiR-671 è contenuto all'interno del quarto esone del gene ospite CHPF2; le due sequenze sono perfettamente identiche (100% di omologia). In rosso è indicata la regione di *targeting* del miR-671-5p all'interno della *coding sequence*, in giallo sono indicate le tre regioni di *targeting* del miR-671-3p all'interno della *coding sequence* e in particolare, tra queste, la regione dove è localizzato l'hsa-miR-671-5p (sequenza sottolineata).

3.10 IDENTIFICAZIONE DEI TFBSs

Al fine di identificare un meccanismo di regolazione deputato al controllo dei miR-671-5p e miR-671-3p, abbiamo ricercato la presenza dei TFBSs (*Transcription Factor Binding Site*) conservati nelle regioni genomiche a monte e a valle del *premiR-671* e valutato la correlazione di espressione tra TF e i *targets* dei rispettivi miRNA. La ricerca dei TFBSs ha portato all'identificazione di 57 fattori di trascrizione, tra i quali 19 sono stati selezionati per il loro coinvolgimento nel GBM secondo quanto riportato in letteratura (**Tabella 10**).

Tabella 10. Fattori di Trascrizione che controllano l'espressione del miR-671 e loro coinvolgimento nel GBM.

<i>FATTORE DI TRASCRIZIONE</i>	<i>PREDIZIONE</i>	<i>FUNZIONE BIOLOGICA O COINVOLGIMENTO NEL GBM</i>	<i>REFERENZE</i>
AHR	ECR Browser	AHR activation promotes clonogenicity and invasiveness of cancer cells	PMID: 21976023
ARNT	ECR Browser	The aryl hydrocarbon (Ah) receptor is involved in the induction of several enzymes that participate in xenobiotic metabolism	PMID: 19465936
ARNT2	ECR Browser	ARNT2 was highly homologous protein to ARNT, and all are implicated in forming dimers with the various HIF- α subunits	PMID: 19465936
EGR1	ECR Browser	EGR-1, a transcription factor with important functions in the regulation of growth and differentiation, is highly expressed in brain	PMID: 10783396
FOXA2	ECR Browser	Endodermal markers present in glioblastoma	PMID:21483788
FOXC2	ECR Browser	FoxC2 is essential for tumor angiogenesis and disease progression	PMID 204593
FOXM1	ECR Browser	FoxM1B critically regulates the tumorigenicity of glioma cells	PMID: 16585184
FOXO1	ECR Browser	It may play a role in myogenic growth and differentiation	PMID: 15084259
FOXO3	ECR Browser	It may play a role in myogenic growth and differentiation	PMID: 15084259
FOXO4	ECR Browser	It may play a role in myogenic growth and differentiation	PMID: 15084259
HIF1A	ECR Browser	HIF-1 is a potent activator of angiogenesis and invasion	PMID: 19465936
MYOD1	ECR Browser	Hypomethylated in GBM	PMID:12794756
PAX6	ECR Browser	It suppresses growth of human glioblastoma	PMID: 19618119
POU2F1	ECR Browser	It regulates a set of genes that increase glucose metabolism and reduce mitochondrial respiration	PMID: 21258394
POU2F2	ECR Browser	The protein encoded by this gene is a homeobox-containing transcription factor of the POU domain family	PMID:21712563
RUNX1	ECR Browser	Oncogenic pathways	PMID: 22000015
RUNX2	ECR Browser	Runx2 mediates the expression of galectin-3	PMID:18438928
TCF3	ECR Browser	Expression of oligodendrocyte lineage	PMID:14730454
TFAP2A	ECR Browser	Amplification in GBM	PMID: 16232199

In accordo all'ipotesi che i miRNA e i TF potrebbero avere un effetto combinatoriale di regolazione sui loro *targets*, noi abbiamo analizzato la correlazione che esiste fra di loro. Questo si basa sul fatto comunemente accettato che se un TF promuove direttamente l'espressione di un miRNA, il *target* di questo miRNA dovrebbe avere un opposto profilo d'espressione



Dall'analisi è emerso che SHC3, *target* del miR-671-5p, risulta positivamente correlato ai TF FOXC2, FOXO4, MYOD1, POU2F2 e RUNX1, aventi tutti un importante coinvolgimento nel GBM. Non meno importante è EDN1, *target* validato del miR-671-5p, il quale risulta correlato al TF FOXO3 (**Figura 35 A**). Interessanti anche GRB10 e IGF1R, entrambi *targets* del miR-671-3p, i quali risultano positivamente correlati, dato l'alto numero di *score*, rispettivamente ai TF (AHR, ARNT2, EGR1, FOXO1) e (FOXA2, FOXO3, HIF1A, POU2F2) accomunati tutti dai medesimi meccanismi di regolazione della proliferazione cellulare, invasività, angiogenesi e differenziamento. PIP5K1A, *target* del 3p, è correlato positivamente ad ARNT e correlato negativamente a POU2F1, come mostrato nella **Figura 35 B**.

3.11 ANALISI DELLE NETWORKS

Dopo aver individuato i *targets* del miR-671-5p e miR-671-3p, i TF ed i loro interattori, abbiamo costruito due *networks*:

- ✓ la *network* del miR-671-5p;
- ✓ la *network* del miR-671-3p.

Network del miR-671-5p

La *network* del miR-671-5p costruita sulla base dei suoi TF, *targets* e dei loro primi interattori consiste di 1611 nodi e 3989 *edges* (**Figura 36 A**). Dopo aver effettuato l'analisi della centralità nella *network* abbiamo trovato che YWHAQ, NR3C1, TCF3, HIF1A, MYOD1, RUNX2 e sono i geni che presentano il più alto *degree*. In particolare, MYOD1 con 142 interazioni, come riportato in letteratura, risulta fortemente ipometilato in differenti sottotipi di glioma [117]. Dall'analisi delle GO della *network* del miR-671-5p, si nota come i TF e i *targets* aventi il maggior numero di interazioni, siano coinvolti in processi di

proliferazione cellulare, angiogenesi e differenziamento cellulare. Inoltre molti TF e *targets* del miR-671-5p svolgono un ruolo centrale nel GBM, come il TF FOXA2, *marker* endodermale nel GBM; infatti è stato dimostrato che i gliomi di alto grado sono capaci di attivare programmi genetici che portano a trasformazioni mesenchimali e soppressione dell'espressione genica neuronale e gliale specifica [118]. EDN1, *target* validate del miR-671-5p, *marker* nel GBM, promuove la progressione del tumore. È stato suggerito che l'inattivazione del recettore EDN potrebbe essere una nuova strategia nella terapia contro il cancro [119]. Interessante anche il TF Forkhead box M1 (FoxM1) il quale nei gliomi maligni risulta sovra-espresso a differenza del tessuto *brain* normale. Secondo dati di letteratura infatti il livello della proteina di FoxM1 è correlato direttamente con il grado del glioma ed inversamente correlato con la sopravvivenza del paziente. È stato inoltre dimostrato che l'inibizione dell'espressione di FoxM1 nelle cellule U87MG blocca la crescita in vitro e la tumorigenesi in vivo. Quindi, FoxM1 potrebbe essere un nuovo potenziale *target* nella terapia contro i gliomi maligni [120].

Network del miR-671-3p

Considerando gli interattori dei *targets*, nonché i 57 TFs individuati come più probabili loro diretti regolatori, gli interattori di tali TFs ed il miR-671-3p è stata costruita una *network* di 1134 nodi e 3095 *edges* (**Figura 36 B**). Dopo aver effettuato l'analisi della centralità abbiamo trovato che SIN3A, NR3C1, TCF3, MYOD1 e HIF1A sono i geni che presentano il più alto *degree*. In particolare SIN3A ha 297 interattori nella *network*. Il suo coinvolgimento nel GBM è stato riportato in letteratura, sembra infatti che collabori come co-repressore di Mixi-1, un membro della famiglia Mad, repressore trascrizionale del gene c-Myc. Infatti l'abilità di Mixi-1 è quella di interagire con SIN3A nel reclutamento dell'istone deacetilase sui promotori dei geni regolati con conseguente condensazione cromatinica e repressione trascrizionale [121].

Recenti evidenze indicano un possibile ruolo del sistema IGF e in particolare di IGF1R, *target* del miR-671-3p con 129 interazioni, nella modulazione/mediazione della risposta cellulare dei tumori all'ipossia, un comune fenomeno nei tumori solidi, e in particolare nei gliomi maligni, che porta le cellule tumorali alla radio e chemio resistenza che è orchestrata attraverso l'attivazione del fattore di trascrizione che induce l'ipossia, HIF1A [122]. Da notare come i TFs MYOD1 e HIF1A, in entrambe le *networks* dei miR-671-5p e miR-671-3p, sembrano svolgere un ruolo centrale.

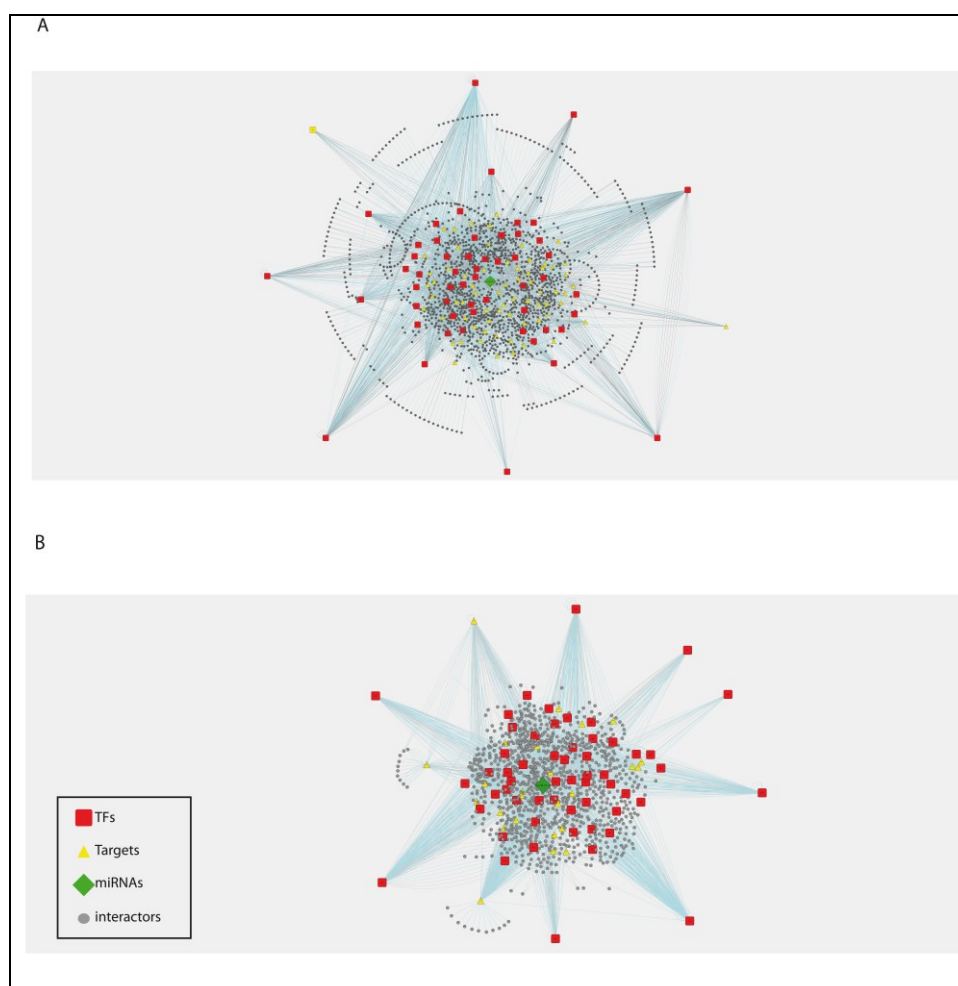


Figura 36. A) Network dei *targets* del miR-671-5p; B) Network dei *targets* del miR-671-3p. I nodi più esterni in entrambe le *networks* rappresentano i geni maggiormente coinvolti nel GBM.

3.12 ANALISI DELLA REGIONE 7q36.1: APPROCCIO AL GENE CANDIDATO

Dal momento che il gene *CHPF2*, assieme ai geni *miR 671-5p* e *miR 671-3p* contenuti al suo interno, è localizzato nella regione q36.1 del cromosoma umano 7, la quale è soggetta a frequenti alterazioni strutturali di tipo *gain*, seguendo il principio della candidatura posizionale, abbiamo voluto verificare un eventuale coinvolgimento di *CHPF2* e del *miR-671* in patologie. I risultati della ricerca riguardante il possibile coinvolgimento della regione 7q36.1 a livello neoplastico, ottenuti da diversi *database* e dalla letteratura, sono mostrati nella **Tabella 11**.

Tabella 11. Neoplasie caratterizzate da riarrangiamenti nella regione 7q36.1.

Neoplasie caratterizzate da riarrangiamenti coinvolgenti la regione 7q36.1					
Modello tumorale	Regione di riarrangiamento	marker associato al riarrangiamento	Tipo di riarrangiamento	Database di riferimento	Referenze
Glioblastoma	7q36.1		Gain	Progenetix, UCSC	Case Rep Oncol 2009;2:103–110
Astrocytoma	7q36.1		Gain	Progenetix	Cancer Genetics and Cytogenetics 151 (2004) 162–170
Chordoma	7q36.1		Gain	Progenetix	GENES, CHROMOSOMES & CANCER 32:203–211 (2001)
Medullary Thyroid Carcinoma (MTC)(rappresentano circa il 3-6% dell'intera popolazione di tumori tiroidei. Il rimanente 94-97% è costituito da tumori follicolari)	7q36.1	151686560-152069929	Loss		J Clin Endocrinol Metab, November 2008 93(11):4367–4372
Barrett's Esophagus	7q36.1	D7S2426	Loss		[CANCER RESEARCH 62, 1531–1533, March 1, 2002]
Gastric carcinoma	7q36.1	D7S636 (NOS3)	Loss		World J Gastroenterol April 21, 2006; ANTICANCER RESEARCH 25: 913-916 (2005)
Lung Adenocarcinomas	7q36.1		Gain		Lung (2006) 184:355–362
prostate cancer	7q36.1		Gain		Frontiers in Bioscience 12, 3287-3301, May 1, 2007
A gastrointestinal stromal tumor (GIST)	7q32; 7q34-36		Loss		Technology in Cancer Research and Treatment ISSN 1533-0346

3.13 PROFILING DI CHPF2 E DEI miR-671-5p E miR-671-3p SU BIOPSIE PARAFFINATE DI GLIOBLASTOMA MULTIFORME

Dall'analisi di espressione condotta in Real Time PCR, il gene ospite CHPF2 è sottoespresso da 1 a 41 volte rispetto al controllo Parenchima Cerebrale fetale (PC1) nel 55% dei campioni analizzati; solo in un campione è sovraespresso di 3 volte. A partire dalle stesse biopsie è stata effettuata anche un'indagine d'espressione delle due forme mature del miR-671; il miR-671-5p è sottoespresso da 2 a 6 volte e solo in tre biopsie (GBM9, GBM23 e GBM28) è sovra espresso da 4 a 16 volte rispetto PC1; il miR-671-3p si è sottoespresso da 8 a 311 volte rispetto a PC1 (**Figura 37**). In base ai dati fin'ora ottenuti, è interessante notare come entrambe le forme mature del miRNA mostrino un generale *trend* di sottoespressione vs. il controllo adoperato; in particolare, il miR-671-3p ha mostrato un comportamento omogeneo nei diversi campioni di Glioblastoma analizzati.

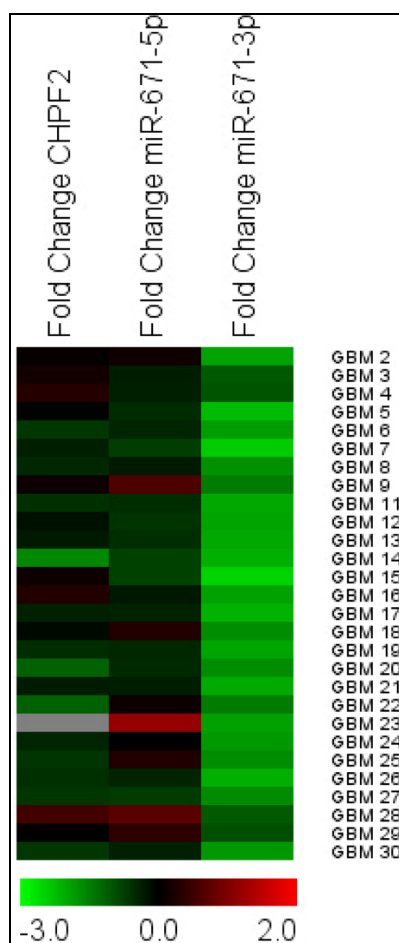


Figura 37. Valori di *Fold Change* del gene ospite CHPF2 e dei miR-671-5p e miR-671-3p in 29 biopsie di GBM (campioni paraffinati), utilizzando come controllo RNA da Parenchima Cerebrale fetale. La *colour scale* indica i relativi livelli di espressione di ogni gene. Il *bar code* alla base rappresenta la *colour scale* del log₁₀ dei valori.

3.14 MODULAZIONE *IN VITRO* DELL'ESPRESSIONE DEI miR-671-5p E miR-671-3p

Per verificare se la modulazione dei due miRNA influisca sull'espressione di alcuni loro *targets* predetti, presi da noi in considerazione sia per il loro ruolo centrale nelle rispettive *networks* biologiche, che per il loro coinvolgimento nel modello tumorale da noi preso in considerazione abbiamo effettuato esperimenti *in vitro*. L'efficienza di trasfezione a 24 e 48 h è stata pari all'82% con pre-miRs e anti-miRs (671-5p e 671-3p) in cellule U87MG. In particolare abbiamo analizzato l'espressione di KRAS e SHC3, *targets* del miR-671-5p e

di IGF1R e SIN3A, *targets* del miR-671-3p, dopo trasfezione, per determinarne la cinetica di variazione trascrizionale dei *targets* in questione in relazione ai due miRNA. I risultati in **Figura 38** sembrerebbero mostrare un tendenziale andamento opposto d'espressione dopo trasfezione con pre-miRs e anti-miRs (671-5p e 671-3p) in cellule U87MG.

Inoltre, dati i risultati da noi ottenuti sul pannello RNA Ambion®, abbiamo analizzato la variazione d'espressione, dopo accensione e spegnimento dei miR-671-5p e miR-671-3p, delle due varianti trascrizionali di *CHPF2*, *Long2* e *Monoexonic*. e come si può notare nella **Figura 38** sottostante, la variante *Long2* risulta sovraespressa (*Fold Change* = 8.98) dopo spegnimento del miR-671-3p nelle U87MG; ciò potrebbe confermare l'ipotesi del *targeting* del miR-671-3p su questa variante.

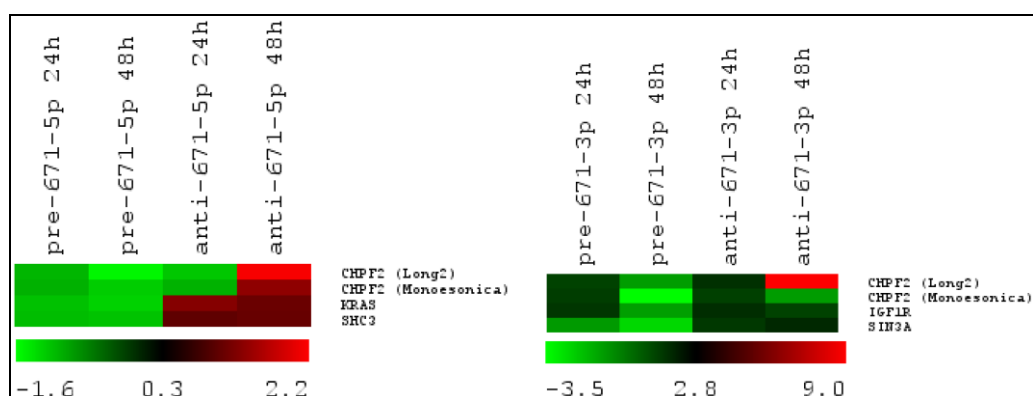


Figura 38. Valori d'espressione dei *targets* dei miR-671-5p e miR-671-3p dopo trasfezione delle cellule U87MG con pre-671-5p, anti-671-5p, pre-671-3p e anti-671-3p.

Il nostro obiettivo successivo è stato vedere se, dopo accensione e spegnimento di entrambi i miRNA, vi fosse una modulazione anche nell'espressione della proteina *CHPF2* (isoforma *Long2*). Il punto analizzato dato il risultato a livello di trascritto è stato dopo 48 h l'evento di trasfezione. I risultati ottenuti sono mostrati rispettivamente nella **Figura 39 A e B**, sottostante:

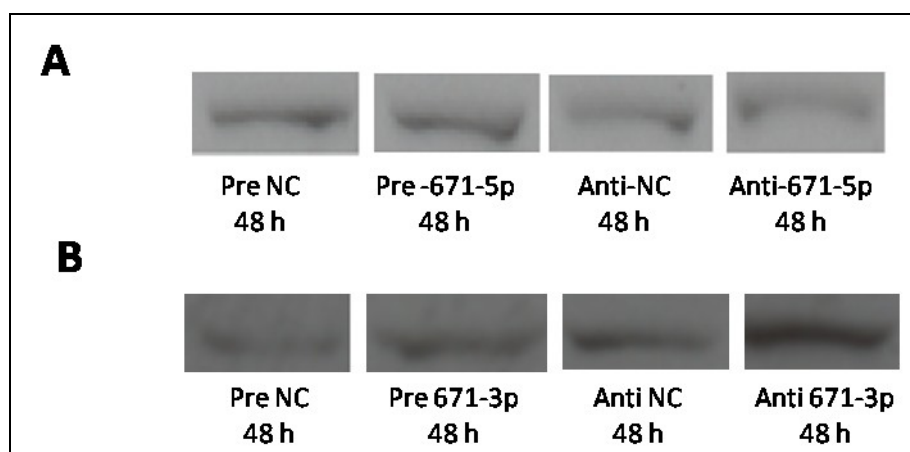


Figura 39. **A)** Analisi Western dopo trasfezione in cellule U87MG con pre-671-5p e anti-671-5p a 48; **B)** Analisi Western dopo trasfezione in cellule U87MG con pre-671-3p e anti-671-3p 48; la proteina analizzata è CHPF2, il controllo endogeno utilizzato è stato β -actina.

I nostri risultati hanno mostrato solo una parziale sovrapposizione tra i dati del trascritto e quelli della proteina. In particolare l'isoforma *Long2*, che aumentava la sua espressione come trascritto nelle U87MG di circa 8.98 in seguito all'evento di trasfezione con anti-671-3p dopo 48 h, incrementava di circa 1.64 volte a livello proteico.

4. DISCUSSIONE

Molte evidenze sperimentali negli ultimi anni hanno dimostrato che i miRNA localizzati all'interno delle *coding sequences* (CDSs) risultano essere funzionali nel controllo dell'espressione genica. I miRNA sono piccole molecole endogene di RNA che giocano un ruolo principale nello sviluppo e nelle patologie attraverso la regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica. Essi sono parti del *RNA-induced silencing complex* (RISC) e lo guidano verso specifici *miRNA recognition elements* (MREs) sulla molecola di mRNA del gene *target*. Questo fenomeno porta a reprimere la traduzione e/o a degradare l'mRNA [123]. Sebbene molti di questi MRE sono stati trovati nei 3'UTRs dei geni codificanti proteine [124], ci sono molti esempi di MREs localizzati in CDSs di geni *targets* con relative informazioni sulla loro funzione biologica [125]. Nel lavoro di Duursma *et al.* (2008) [126], ad esempio, è stato mostrato che il miR-148 reprime specifiche varianti di *splicing* della DNA methyltransferase 3b (Dnmt3b) targettando la sua *coding sequence* e questo meccanismo potrebbe giocare un ruolo nel determinare la relativa abbondanza delle differenti varianti di *splicing* oppure Forman *et al.* (2008) [127] hanno dimostrato che quattro *targets* del miRNA let-7, siti dentro la CDS dell'enzima Dicer stabiliscono un meccanismo miRNA/Dicer *autoregulatory feedback loop*. Un altro esempio è dato da Elcheva *et al.* (2009), i quali hanno dimostrato che [128] la *coding sequence* del gene β -transducin repeat containing protein 1 è regolata dal miR-183.

Reczko *et al.* (2012) [129] inoltre, attraverso dati *high-throughput* di immunoprecipitazione e di sequenziamento, hanno riportato un esempio di analisi computazionale di come i miRNA si legano ai loro siti. L'analisi è stata eseguita indipendentemente per la CDS e per le regioni 3'UTRs, rivelando

differenti caratteristiche per le due regioni, in particolare i risultati hanno indicato che i geni con i 3'UTRs più piccoli sono preferenzialmente *targettati* nella CDS, suggerendo che la selezione evolutiva potrebbe favorire siti addizionali nella CDS nei casi dove nel 3'UTR lo spazio è ristretto. Gli autori di questo lavoro affermano anche che gli MREs nella CDS preferenzialmente richiedono un legame più forte degli MREs nel 3'UTR. Inoltre gli MREs nelle *coding sequence* richiedono un perfetto legame con la regione *seed* del miRNA e possibili *mismatches* distruggono il loro funzionamento, come confermato anche da Fang e Rajewsky (2011) [130].

I risultati ottenuti in questo lavoro lascerebbero supporre che il miR-671 regoli l'espressione di specifiche varianti di *splicing* del gene CHPF2 a livello di un particolare tessuto. Infatti, i dati di espressione, riportati in questa tesi, circa le due varianti *Long2* e *Monoesonica* di CHPF2 nel pannello di tessuti ed organi RNA Ambion® mostrano che entrambe le varianti trascrizionali sembrano essere ubiquitarie e la loro espressione è piuttosto variabile nei diversi campioni analizzati. Il livello massimo d'espressione è stato riscontrato in *placenta* (in particolar modo per l'isoforma *Long2*), dove i proteoglicani condroitin solfato sono coinvolti nella regolazione dello sviluppo e nella comunicazione intercellulare [131]. Livelli molto bassi d'espressione si osservano in *brain* e *testis*. Complessivamente, i dati d'espressione dell'isoforma *Long2* confermano i dati riscontrati in letteratura [63], mentre la variante *Monoexonic*, da noi ottenuta dalle precedenti analisi computazionali, tramite l'assemblaggio delle *EST*, è stata validata sperimentalmente per la prima volta. Da un'attenta analisi dei nostri dati, dunque, si evidenzia che l'espressione delle due isoforme sembrerebbe non essere identica. Ciò farebbe presupporre che la presenza o l'assenza del *premiRNA* possa avere un certo effetto sul gene ospite e di conseguenza anche un preciso ruolo biologico nel tessuto o organo che esprime l'una o l'altra variante. Per rispondere a questo interrogativo abbiamo studiato contemporaneamente l'espressione del gene ospite in relazione ai miR-671-5p e miR-671-3p. Inoltre al fine di poter

evidenziare una correlazione d'espressione tra le due varianti trascrizionali e le due forme mature del miRNA nel pannello di tessuti ed organi RNA Ambion® abbiamo consultato il programma *Statistica* per effettuare un test di correlazione di *Pearson*. Da questi dati emerge che non si può parlare di un'effettiva anticorrelazione di espressione tra le due varianti trascrizionali del gene ospite CHPF2 e le due forme mature del miRNA. Tuttavia il valore maggiormente significativo è stato riscontrato nella coppia di dati miR-671-3p/*Long2* (-0.37), dunque potrebbe essere ipotizzabile, data la peculiare posizione del *premiR-671* all'interno del quarto esone di tale variante, un *targeting* del miRNA sul gene ospite. Inoltre dato il risultato ottenuto tramite il *tool* di predizione RNA22, tale *targeting* potrebbe avvenire sulla CDS di CHPF2, questo rappresenterebbe un caso peculiare ma non raro in letteratura [126, 133, 134]. Infatti i nostri risultati sperimentali suggeriscono in generale un andamento opposto d'espressione del miRNA maturo e del gene ospite per la maggior parte dei tessuti, in modo particolare per la variante *Long2* ed il miRNA-671-3p. Nel caso di *brain* ed *adipose* (in misura maggiore in *brain*) questo dato risulta notevolmente marcato: alti livelli di espressione del miRNA e bassi livelli di espressione del gene ospite. In *placenta* osserviamo bassi livelli del miRNA a cui corrisponde un alto livello di espressione del gene ospite.

Inoltre dato che il miR-671 e il gene ospite CHPF2 sono localizzati nella regione q36.1 del cromosoma 7 e quest'ultima regione risulta essere soggetta a riarrangiamenti ed aberrazioni, seguendo il principio della candidatura posizionale, abbiamo indagato sul possibile coinvolgimento di tali geni a livello neoplastico (**Tabella 11**). Come primo modello di studio è stato scelto il GBM poiché esso è uno dei più frequenti tumori maligni cerebrali nell'uomo ed è caratterizzato nella maggior parte dei casi da una prognosi infausta, con un'aspettativa di vita del paziente di circa 14 mesi dopo la diagnosi [66], inoltre ricerche in banche dati contenenti dati di *CGH-arrays* (*database* di riferimento: Progenetix ed *UCSC Cancer Genomics Browser*) ed in letteratura

[75] hanno mostrato che il cromosoma 7 è *in gain* nella maggior parte dei glioblastomi analizzati. Il GBM è risultato quindi un modello interessante da studiare ai fini della verifica di un possibile coinvolgimento del miR-671 nella sua patogenesi, in quanto è un gene candidato posizionale in questa patologia, e da nostri dati sperimentali, come mostrato nella **Figura 30** risulta essere particolarmente abbondante (e dunque, con ogni probabilità, funzionalmente importante) in *brain* in condizioni fisiologiche. Quindi, lo scopo di questo lavoro è stato quello di effettuare il *profiling* d'espressione delle due forme mature del miR-671 e del gene ospite CHPF2 nel suddetto tumore, al fine di individuarne, così, un possibile ruolo nella patogenesi di questo tumore. I risultati sperimentali ottenuti hanno evidenziato un generale *trend* di sottoespressione sia di CHPF2 che delle due forme mature del miR-671 (**Figura 37**). Nello specifico, è interessante notare come il miR-671-3p abbia mostrato un comportamento omogeneo nei diversi campioni di glioblastoma analizzati, con un generale *trend* di sottoespressione vs. il controllo adoperato da 8 a 311 volte. Per di più, ciò si verifica in un tumore che, sia per sue caratteristiche intrinseche (non a caso si parla di glioblastoma multiforme), sia per sua sede di sviluppo (parenchima cerebrale), mostra una marcata eterogeneità fenotipica e molecolare.

Una possibile spiegazione di questo dato potrebbe essere, come dimostrato da Avraham et al. (2010), il ruolo oncosoppressivo di 23 miRNA tra cui quello del miR-671, nel tumore al seno e nel GBM, dopo stimolazione con il fattore di crescita epidermico (EGF). Usando approcci *genome-wide*, questi ricercatori hanno dimostrato che la stimolazione con EGF dà inizio ad un programma trascrizionale coordinato tra miRNA e fattori di trascrizione. Essi, infatti, affermano che i geni della risposta precoce ad EGF portano ad una diminuzione del livello d'espressione di questo subset di miRNA e ciò permetterebbe una rapida induzione di fattori di trascrizione oncogenici. Questi risultati porterebbero ad identificare specifici miRNA, tra cui il miR-671, come repressori della crescita e della proliferazione [135, 136]. Inoltre, la

sottoespressione del miR-671 potrebbe essere spiegata dalla sua relazione con fattori di trascrizione, i quali andrebbero a reprimere la sua attività in un tumore così aggressivo come il GBM. In particolare, grazie all'analisi della correlazione di espressione tra i TFs e miRNA abbiamo identificato AHR, FOXA2, FOXC2, FOXM1, HIF1A come i TF che svolgono un ruolo oncogenico nel GBM e che quindi potrebbero reprimere l'azione oncosoppressiva del miR-671. Un esempio è dato dal TF *aryl hydrocarbon receptor* (AHR) la cui attivazione promuove l'invasività tumorale [137]. FoxC2, critico per la formazione vascolare durante lo sviluppo, secondo recenti studi, è risultato espresso negli endoteli tumorali sia dell'uomo che del topo [138]. Inoltre dall'analisi dei *targets* dei miRNA-671-5p e miR-671-3p è emerso che la maggior parte di essi sono coinvolti in processi di regolazione della trascrizione, della proliferazione cellulare, dell'apoptosi. Ad esempio, l'inibizione dell'espressione di KRAS, target del miR-671-5p, nel GBM, risulterebbe coinvolta nella regressione apoptotica del tumore e nell'aumento della sopravvivenza dei topi affetti da tumore, questo quindi suggerirebbe che il *signaling* di KRAS è richiesto per il mantenimento del tumore in vivo. La successiva ri-espressione di KRAS riattiverebbe la crescita tumorale, indicando che alcune cellule progenitrici sopravvivono e mantengono la proprietà tumorigenica [139]. Anche Shc3, *target* del miR-671-5p, sembra essere coinvolto nella patogenesi del GBM, infatti, sembrerebbe avvenire in questo tumore uno scambio selettivo del livello d'espressione tra i geni Shc1 ad Shc3 con passaggio dalla maturazione dei precursori neuronali a quella dei neuroni postmitotici. Precedenti studi hanno mostrato che nell'embrione, Shc1 è altamente espresso nelle cellule staminali del CNS, mentre è silenziato nei neuroni maturi, dove è sostituito da Shc3. Sotto normali condizioni Shc3 non è espresso nelle cellule gliali. Negli astrocitomi e glioblastomi, il normale *pattern* d'espressione di Shc1/Shc3 è totalmente sovvertito, essendo entrambe le proteine presenti allo stesso tempo e nelle stesse cellule [140]. In seguito alla modulazione *in vitro* dell'espressione del miR-671-5p, analizzando l'espressione di KRAS e di Shc3, i risultati ottenuti (**Figura 38**) sembrerebbero

mostrare un tendenziale andamento opposto d'espressione dopo trasfezione con pre-miR-671-5p e anti-miR-671-5p in cellule U87MG. Particolare attenzione va ad EDN1, il quale è stato identificato come unico *target* validato del miR-671-5p, come dimostrato da Ben-Moshe e al. (2012) [114]. EDN1 è stato trovato comunemente sovra espresso in tanti tumori; alcuni esempi sono rappresentati dalle cellule squamose del tumore all'esofago, dove la sua up-regolazione è associata con migrazione cellulare, metastasi ed invasione; il tumore al seno, dove l'aumentata espressione di EDN1 porta ad aumentare l'invasività tumorale. Anche nel GBM è stato dimostrato un aumento di EDN1 ed il blocco del recettore di EDN è stato suggerito come una nuova strategia nella terapia contro il tumore [119]. Tra i *targets* del miR-671-3p, IGF1R, è frequentemente sovra espresso nei tumori e media proliferazione e protezione apoptotica. Esso influenza anche l'ipossia, la motilità e l'adesione cellulare tumorale, rappresentando un *target* terapeutico per il trattamento anti tumore [141]. Interessante è il risultato ottenuto in seguito alla modulazione *in vitro* dell'espressione del miR-671-3p; analizzando l'espressione di IGF1R, si evidenzia un tendenziale andamento opposto d'espressione dopo trasfezione con pre-miR-671-3p e anti-miR-671-3p in cellule U87MG, come mostrato nella **Figura 38**. GRB10, secondo dati di letteratura, è stato individuato come nuovo oncogene nel GBM. Dall'analisi delle *networks* dei miRNA-671-5p e miRNA-671-3p si può notare come i geni con il maggiore numero di interattori, siano coinvolti in processi di regolazione della trascrizione, della proliferazione e della staminalità.

Analizzando attentamente i risultati ottenuti, in particolare la sottoespressione del miRNA-671-3p in maniera omogenea in una coorte di 29 biopsie di GBM, e il lavoro di Ben-Moshe sul *targeting* del miR-671-5p su EDN1, lascerebbero ipotizzare che il miRNA sia coinvolto nella patogenesi del GBM [114, 136].

5. CONCLUSIONI

Protagonista di questa tesi è il miR-671, localizzato all'interno del quarto esone del gene ospite CHPF2. Questo rappresenta un caso particolare di un miRNA localizzato in un esone di un'unità trascrizionale di un gene di 2° classe, che codifica per una proteina funzionalmente attiva.

Data la peculiarità del caso, l'obiettivo della nostra ricerca è stato quello di verificare le eventuali correlazioni tra l'espressione del gene ospite e quella del miRNA maturo, in modo tale da poter costruire delle ipotesi sugli effetti che questa correlazione potrebbe avere sia a livello fisiologico che patologico. Attraverso l'analisi delle *Expressed Sequence Tags (ESTs)*, abbiamo messo in evidenza quattro isoforme di CHPF2 e validato sperimentalmente per la prima volta in letteratura la variante *Monoexonic*, a livello di trascritto, nonché le varianti da noi definite *Long2* e *Short* sia a livello di trascritto che a livello proteico. Inoltre abbiamo messo a paragone i profili di espressione di due delle quattro varianti trascrizionali (*Long2* e *Monoexonic*), cercando di comprendere in questo modo la possibile correlazione tra l'espressione del miRNA e quella del gene ospite. Il *database* di predizione di *targets* RNA22 ha identificato una regione di *targeting* a livello della *coding sequence* del quarto esone di CHPF2 per il miR-671-5p e tre regioni di *targeting* per il miR-671-3p.

Il gene CHPF2, assieme a quello codificante per il miR-671, contenuto al suo interno, è localizzato nella regione q36.1 del cromosoma umano 7. Questa regione è soggetta a frequenti alterazioni strutturali di tipo *gain* in diverse neoplasie. Utilizzando l'approccio della candidatura posizionale, abbiamo identificato e caratterizzato alterazioni della struttura e della espressione di CHPF2 nel Glioblastoma Multiforme (GBM), un tumore maligno costituito da cellule di origine gliale e caratterizzato da riarrangiamenti strutturali della regione 7q36.1.

A tal fine è stato effettuato il *profiling* d'espressione del miR-671, nelle due forme mature -3p e -5p, e del gene ospite CHPF2 in una coorte di 29 biopsie paraffinate di GBM, grazie alla tecnologia *Taq-Man*, al fine di correlare il profilo d'espressione del miRNA a quello del gene ospite, individuandone così un possibile ruolo nella patogenesi di questo tumore. I risultati sperimentali ottenuti hanno evidenziato un generale *trend* di sottoespressione sia di CHPF2 che delle due forme mature del miR-671. Interessante, il dato più robusto è stato quello riguardante l'omogenea sottoespressione del miR-671-3p nei diversi campioni di glioblastoma analizzati vs. il controllo utilizzato. Lo studio dei *targets* predetti del miR-671-5p, del miR-671-3p e delle relative *networks* biologiche ha consentito di identificare diverse *pathways*, correlate al processo neoplastico e potenzialmente regolate dai due miRNA, in particolare i risultati ottenuti lascerebbero ipotizzare che il miRNA sia coinvolto nella patogenesi del GBM. Potrebbe risultare anche interessante validare tramite saggio di luciferasi, alcuni *targets* da noi individuati grazie all'analisi delle *networks* biologiche, ed alcuni di essi analizzati a livello di trascritto dopo trasfezione e risultanti potenzialmente interessanti nell'etiopatogenesi del GBM.

Prospettiva futura di questo lavoro sarà verificare, tramite il test della luciferasi, se il gene CHPF2 è da considerarsi uno dei *target* dei miR-671-5p e miR-671-3p e se ciò dovesse essere confermato, intendiamo verificare tramite mutagenesi sito-specifica se la *coding sequence* di CHPF2 sia la regione di effettivo *targeting*.

BIBLIOGRAFIA

1. Yong Zhao and Deepak Srivastava. A developmental view of microRNA function. Trends Biochem Sci. 2007 Apr;32(4):189-97. Epub 2007 Mar 9.
2. Zhang B, Wang Q, Pan X. MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants. J Cell Physiol. 2007 Feb;210(2):279-89.
3. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. Cell. 1993 Dec 3;75(5):843-54.
4. Wightman, B., Ha, I. & Ruvkun, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. Cell. 1993 Dec 3;75(5):855-62.
5. Ambros, V. The evolution of our thinking about microRNAs. Nat Med. 2008 Oct;14(10):1036-40.
6. Berezikov, Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. Nat Rev Genet. 2011 Nov 18;12(12):846-60.
7. Reinhart, B. J. et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. Nature. 2000 Feb 24;403(6772):901-6.
8. Pasquinelli, A. E. et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. Nature. 2000 Nov 2;408(6808):86-9.
9. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. & Tuschl, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. Nature. 2000 Nov 2;408(6808):86-9.
10. Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G. & Bartel, D. P. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. Science. 2001 Oct 26;294(5543):858-62.

11. Hertel, J. et al. The expansion of the metazoan microRNA repertoire. *BMC Genomics*. 2006 Feb 15;7:25.
12. Heimberg, A. M., Sempere, L. F., Moy, V. N., Donoghue, P. C. & Peterson, K. J. MicroRNAs and the advent of vertebrate morphological complexity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Feb 26;105(8):2946-50.
13. Ibanez-Ventoso, C., Vora, M. & Driscoll, M. Sequence relationships among *C. elegans*, *D. melanogaster* and human microRNAs highlight the extensive conservation of microRNAs in biology. *PLoS One*. 2008 Jul 30;3(7):e2818.
14. Chapman, E. J. & Carrington, J. C. Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nature Rev. Nat Rev Genet*. 2007 Nov;8(11):884-96.
15. Millar, A. A. & Waterhouse, P. M. Plant and animal microRNAs: similarities and differences. *Funct Integr Genomics*. 2005 Jul;5(3):129-35.
16. Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA. *Trends Genet*. 2006 Mar;22(3):165-73. Epub 2006 Jan 30.
17. Hinske, Pedro AF Galante, Winston P Kuo, Lucila Ohno-Machado, A potential role for intragenic miRNAs on their hosts' interactome. Hinske et al. *BMC Genomics*. 2010 Oct 1;11:533.
18. Baskerville S, Bartel DP: Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA*. 2005 Mar;11(3):241-7.
19. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A: Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*. 2004 Oct;14(10A):1902-10.
20. Morlando M, Ballarino M, Gromak N, Pagano F, Bozzoni I, Proudfoot N: Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally. *Nat Struct Mol Biol*. 2008 Sep;15(9):902-9.
21. Kim Y-K, Kim VN: Processing of intronic microRNAs. *EMBO J*. 2007 Feb 7;26(3):775-83.
22. Obernosterer G, Leuschner PJF, Alenius M, Martinez J: Post-transcriptional regulation of microRNA expression. *RNA*. 2006 Jul;12(7):1161-7.

23. Blenkiron C, Goldstein LD, Thorne NP, Spiteri I, Chin S-F, 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.
24. Lee EJ, Baek M, Gusev Y, Brackett DJ, Nuovo GJ, Schmittgen TD: Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors. *RNA.* 2008 Jan;14(1):35-42.
25. Thomson JM, Newman M, Parker JS, Morin-Kensicki EM, Wright T, Hammond SM: Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev.* 2006 Aug 15;20(16):2202-7.
26. Merritt WM, Lin YG, Han LY, Kamat AA, Spannuth WA, Schmandt R, Urbauer D, Pennacchio LA, Cheng J-F, Nick AM, et al: Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer. *N Engl J Med.* 2008 Dec 18;359(25):2641-50.
27. 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 Oct 13;23(20):4051-60.
28. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA.* 2004 Dec;10(12):1957-66.
29. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol.* 2006 Dec;13(12):1097-101.
30. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S: Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol.* 2009 Mar;11(3):228-34.
31. Kim VN: MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 May;6(5):376-85.
32. Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science.* 2004 Jan 2;303(5654):95-8.
33. 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 Aug 3;293(5531):834-8.

34. 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 Oct 15;15(20):2654-9.
35. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell.* 2003 Oct 17;115(2):199-208.
36. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with big role in gene regulation. *Nat Rev Genet.* 2004 Jul;5(7):522-31.
37. Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature.* 2007 Jul 5;448(7149):83-6.
38. Carthew RW and Sontheimer EJ: Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 2009 February 20; 136 (4): 642–655.
39. Zeng Y, Sankala H, Zhang X & Graves PR: Phosphorylation of Argonaute 2 at serine-387 facilitates its localization to processing bodies. *Biochem. J.* 2008; 413: 429–436.
40. Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ & Parker R: MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nature Cell Biol*, 2005; 7: 719–723.
41. Sen GL & Blau HM: Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nature Cell Biol*, 2007; 7: 633–636.
42. Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, Baillat D, Gregory RI, Liebhaber SA, Pasquinelli AE, Shiekhattar R: MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature*, 2007; 447:823–828.
43. Wang YP and Li KB: Correlation of expression profiles between microRNAs and mRNA targets using NCI-60 data. *BMC Genomics*, 2009; 10 :218.
44. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature.* 2005, 435:839-43.
45. 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.

46. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet.* 2010, 11:597-610.
47. Paroo Z, Ye X, Chen S, Liu Q. Phosphorylation of the human microRNA-generating complex mediates MAPK/Erk signaling. *Cell.* 2009, 139:112-22.
48. Krol J, Busskamp V, Markiewicz I, Stadler MB, Ribi 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.
49. 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 (6): 515-23.
50. Stefanie Sassen & Eric A. Miska & Carlos Caldas. MicroRNA—implications for cancer. *Virchows Arch.* 2008 Jan;452(1):1-10.
51. 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 Mar 2;101(9):2999-3004.
52. 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.
53. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006, 6:259-69.
54. Brown BD, Naldini L. Exploiting and antagonizing microRNA regulation for therapeutic and experimental applications. *Nat Rev Genet.* 2009, 10:578-85.
55. 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.
56. 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.
57. Bishop JR, Schuksz M, Esko JD. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature*. 2007 Apr 26;446(7139):1030-7.
58. Silbert JE, Sugumaran G. Biosynthesis of chondroitin/dermatan sulphate. *IUBMB Life*. 2002 Oct;54(4):177-86.
59. Prydz K, Dalen KT. Synthesis and sorting of proteoglycans. *J Cell Sci*. 2000 Jan;113 Pt 2:193-205.
60. Fumiko Matsui and Atsuhiko Oohira. Proteoglycans and injury of the central nervous system. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2004 Dec;44(4):181-8.
61. Díaz-Martínez NE, Velasco I. Axonal growth inhibition by chondroitin sulfate proteoglycans in the central nervous system. *Rev Invest Clin*. 2009 Mar-Apr;61(2):140-9.
62. Kwok JC, Afshari F, García-Alías G, Fawcett JW. Proteoglycans in the central nervous system: plasticity, regeneration and their stimulation with chondroitinase ABC. *Restor Neurol Neurosci*. 2008;26(2-3):131-4.
63. Gotoh M, Yada T, Sato T, Akashima T, Iwasaki H, Mochizuki H, Inaba N, Togayachi A, Kudo T, Watanabe H, Kimata K, Narimatsu H. Molecular Cloning and Characterization of a Novel Chondroitin Sulfate Glucuronyltransferase That Transfers Glucuronic Acid to N Acetylgalactosamine. *J Biol Chem*. 2002 Oct 11;277(41):38179-88.
64. Izumikawa T, Koike T, Shiozawa S, Sugahara K, Tamura J, Kitagawa H. Identification of chondroitin sulfate glucuronyltransferase as chondroitin synthase-3 involved in chondroitin polymerization: chondroitin polymerization is achieved by multiple enzyme complexes consisting of chondroitin synthase family members. *J Biol Chem*. 2008 Apr 25;283(17):11396-406.
65. Hadjipanayis CG, Van Meir EG. Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies. *Trends Mol Med*. 2009;14:519-530.
66. Erwin G. Van Meir, PhD1; Costas G. Hadjipanayis, MD, PhD2; Andrew D. Norden, MD, MPH3; Hui-Kuo Shu, MD4; Patrick Y. Wen, MD5; Jeffrey J. Olson, MD. Exciting New Advances in Neuro-

- Oncology The Avenue to a Cure for Malignant Glioma. CA Cancer J Clin 2010;60:166-193.
67. Frank B. Furnari, Tim Fenton, Robert M. Bachoo, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. Genes Dev. 2007 21: 2683-2710.
68. Stiver, S.I., Tan, X., Brown, L.F., Hedley-Whyte, E.T., and Dvorak, H.F. VEGF-A angiogenesis induces a stable neovasculature in adult murine brain. J Neuropathol Exp Neurol. 2004 Aug;63(8):841-55.
69. Folkman, J. Angiogenesis: An organizing principle for drug discovery? Nat Rev Drug Discov. 2007 Apr;6(4):273-86.
70. Libermann TA, Nusbaum HR, Razon N, et al. Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. Nature. 1985 Jan 10-18;313(5998):144-7.
71. James CD, Carlom E, Nordenskjold M, Collins VP, Cavenee WK. Mitotic recombination of chromosome 17 in astrocytomas. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Apr;86(8):2858-62.
72. R, Shishodia S, Takada Y, Bhat KP, Reddy SA, Aggarwal BB, Yung WK. PTEN down regulates AP-1 and targets c-fos in human glioma cells via PI3-kinase/Akt pathway. Mol Cell Biochem. 2007 Jun;300(1-2):77-87.
73. Zhao S, Lin Y, Xu W, et al. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha. Science. 2009;324:261-265.
74. Belozorov VE, Van Meir EG. Inhibitors of hypoxia-inducible factor-1 signaling. Curr Opin Investig Drugs. 2006;7:1067-1076.
75. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. Nature. 2008;455: 1061-1068.
76. Thiel, G. et al. Somatic mutations in the neurofibromatosis 1 gene in gliomas and primitive neuroectodermal tumours. Anticancer Res. 1995 Nov-Dec;15(6B):2495-9.
77. Stephens, P. et al. Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. Nature. 2004 Sep 30;431(7008):525-6.

78. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*. 2004 Apr 23;304(5670):554.
79. Gallia GL, Rand V, Siu IM, Eberhart CG, James CD, Marie SK, Oba-Shinjo SM, Carlotti CG, Caballero OL, Simpson AJ, Brock MV, Massion PP, Carson BS Sr, Riggins GJ. PIK3CA gene mutations in pediatric and adult glioblastoma multiforme. *Mol. Mol Cancer Res*. 2006 Oct;4(10):709-14.
80. Esteller, M. et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents.. *N Engl J Med*. 2000 Nov 9;343(19):1350-4.
81. Hegi, M. E. et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005 Mar 10;352(10):997-1003.
82. Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG, Batchelor TT. Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8:610-622.
83. Schmidt NO, Westphal M, Hagel C, et al. Levels of vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor/scatter factor and basic fibroblast growth factor in human gliomas and their relation to angiogenesis. *Int J Cancer*. 1999;84:10-18.
84. Sulman EP, Guerrero M, Aldape K. Beyond grade: molecular pathology of malignant gliomas. *Semin Radiat Oncol*. 2009 Jul;19(3):142-9. 2009:529-552.
85. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, et al. An integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1. *Cancer Cell*. 2010;17:98-110.
86. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med*. 2008;359:492-507.
87. Hwang Y, Latha K, Gururaj A, Rojas M, Bogler O. Aberrant EGFR signaling in glioma. *Cancer Drug Discovery and Development*, 2009, Part 2, 441-459.
88. Thiessen B, Stewart C, Tsao M, et al. A phase I/II trial of GW572016 (lapatinib) in recurrent glioblastoma multiforme: clinical outcomes,

- pharmacokinetics and molecular correlation. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010;65:353-361.
89. Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I, et al. Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med.* 2005;353:2012-2024.
90. van den Bent MJ, Brandes AA, Rampling R, et al. Randomized phase II trial of erlotinib versus temozolomide or carmustine in recurrent glioblastoma: EORTC brain tumor group study 26034. *J Clin Oncol.* 2009;27:1268-1274.
91. Assanah M, Lopez KA, Bruce JN, Canoll P. Modeling gliomas using PDGF-expressing retroviruses. *Cancer Drug Discovery and Development*, 2009, Part 1, 3-27.
92. Kilic T, Alberta JA, Zdunek PR, et al. Intracranial inhibition of platelet-derived growth factor-mediated glioblastoma cell growth by an orally active kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class. *Cancer Res.* 2000;60:5143-5150.
93. Wen PY, Yung WK, Lamborn KR, et al. Phase I/II study of imatinib mesylate for recurrent malignant gliomas: North American Brain Tumor Consortium Study 99-08. *Clin Cancer Res.* 2006;12:4899-4907.
94. David Stokoe and Frank B. Furnari. The PTEN/PI3 kinase pathway in human glioma. *Cancer Drug Discovery and Development*, 2009, Part 2, 315-357.
95. Chang SM, Wen P, Cloughesy T, et al. Phase II study of CCI-779 in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Invest New Drugs.* 2005;23:357-361.
96. Galanis E, Buckner JC, Maurer MJ, et al. Phase II trial of temsirolimus (CCI-779) in recurrent glioblastoma multiforme: a North Central Cancer Treatment Group Study. *J Clin Oncol.* 2005;23:5294-5304.
97. Gerstner ER, Batchelor TT. Clinical agents for the targeting of brain tumor vasculature. *Cancer Drug Discovery and Development*, 2009, Part 3, 731-747.
98. Guo P, Hu B, Gu W, et al. Platelet-derived growth factor-B enhances glioma angiogenesis by stimulating vascular endothelial growth factor expression in tumor endothelia and by promoting pericyte recruitment. *Am J Pathol.* 2003;162:1083-1093.

99. Atkinson JM, Gilbertson RJ, Rich JN. Brain cancer stem cells as targets of novel therapies. *Cancer Drug Discovery and Development*, 2009, Part 3, 1057-1075, DOI: 10.1007/978-1-60327-553-8_44.
100. Robins HI, Wen PY, Chang SM, et al. Phase I study of erlotinib and CCI-779 (temsirolimus) for patients with recurrent malignant gliomas (NABTC 04-02). *J Clin Oncol*. 2007;25:2057.
101. Oliner J, Min H, Leal J, et al. Suppression of angiogenesis and tumor growth by selective inhibition of angiopoietin-2. *Cancer Cell*. 2004;6:507-516.
102. Ciafre SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, Sabatino G et al. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 334: 1351–1358.
103. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 2005; 65: 6029–6033.
104. Godlewski J, Nowicki MO, Bronisz A, Williams S, Otsuki A, Nuovo G et al. Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal. *Cancer Res* 2008; 68: 9125–9130.
105. Silber J, Lim DA, Petritsch C, Persson AI, Maunakea AK, Yu M et al. miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med* 2008; 6: 14–22.
106. Huntly BJP, Gilliland DG. Leukemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 311–321.
107. Stingl J, Caldas C. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nat Rev Cancer* 2007; 445: 111–115.
108. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004; 432: 396–401.
109. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006; 444: 756–760.
110. Bao S, Wu Q, Sathornsumetee S, Hao Y, Li Z, Hjelmeland AB et al. Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 2006; 66: 7843–7848.

111. Wienholds E, Plasterk RH. MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett* 2005; 579: 5911–5922.
112. Ferretti E, De Smaele E, Po A, Di Marcotullio L, Tosi E, Espinola MS et al. MicroRNA profiling in human medulloblastoma. *Int J Cancer* 2009; 124: 568–577.
113. Garzia L, Andolfo I, Cusanelli E, Marino N, Petrosino G, De Martino D et al. MicroRNA-199b-5p impairs cancer stem cells through negative regulation of HES1 in medulloblastoma. *PLoS ONE* 2009; 4: e4998.
114. Bossel Ben-Moshe N, Avraham R, Kedmi M, Zeisel A, Yitzhaky A, Yarden Y, Domany E. Context-specific microRNA analysis: identification of functional microRNAs and their mRNA targets. *Nucleic Acids Res.* 2012 Sep 12, 1–14.
115. Heimberg AM, Sempere LF, Moy VN, Donoghue PC, Peterson KJ. MicroRNAs and the advent of vertebrate morphological complexity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Feb 26;105(8):2946-50.
116. Chen CY, Chen ST, Fuh CS, Juan HF, Huang HC. Coregulation of transcription factors and microRNAs in human transcriptional regulatory network. *BMC Bioinformatics.* 2011 Feb 15;12 Suppl 1:S41.
117. Uhlmann K, Rohde K, Zeller C, Szymas J, Vogel S, Marcinek K, Thiel G, Nürnberg P, Laird PW. Distinct methylation profiles of glioma subtypes. *Int J Cancer.* 2003 Aug 10;106(1):52-9.
118. Carro MS, Lim WK, Alvarez MJ, Bollo RJ, Zhao X, et al. The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours. *Nature* 2010 463: 318–325.
119. Bhalla A, Haque S, Taylor I, Winslet M, Loizidou M. Endothelin receptor antagonism and cancer. *Eur J Clin Invest* 39 Suppl 2009;2:74–77.
120. Liu M, Dai B, Kang SH, Ban K, Huang FJ, Lang FF, Aldape KD, Xie TX, Pelloski CE, Xie K, Sawaya R, Huang S. FoxM1B is overexpressed in human glioblastomas and critically regulates the tumorigenicity of glioma cells. *Cancer Res.* 2006 Apr 1;66(7):3593-602.
121. Engstrom LD, Youkilis AS, Gorelick JL, Zheng D, Ackley V, Petroff CA, Benson LQ, Coon MR, Zhu X, Hanash SM, Wechsler DS. Mxi1-0,

- an alternatively transcribed Mxi1 isoform, is overexpressed in glioblastomas. *Neoplasia*. 2004 Sep-Oct;6(5):660-73.
122. Gariboldi MB, Ravizza R, Monti E. The IGFR1 inhibitor NVP-AEW541 disrupts a pro-survival and pro-angiogenic IGF-STAT3-HIF1 pathway in human glioblastoma cells. *Biochem Pharmacol*. 2010 Aug 15;80(4):455-62.
123. Bartel, D.P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 2009 136, 215–233.
124. Papadopoulos, G.L. et al. The database of experimentally supported targets: a functional update of TarBase. *Nucleic Acids Res.*, 2009 37, D155–D158.
125. Tay, Y. et al. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*, 2008 455, 1124–1128.
126. Duursma, A.M. et al. miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. *RNA*, 2008 14, 872–877.
127. Forman, J.J. and Collier, H.A. The code within the code: microRNAs target coding regions. *Cell cycle*, 2010 9, 1533–1541.
128. Elcheva, I. et al. CRD-BP protects the coding region of betaTrCP1 mRNA from miR-183-mediated degradation. *Mol Cell*, 2009 35, 240–246.
129. Reczko M, Maragkakis M, Alexiou P, Grosse I, Hatzigeorgiou AG. Functional microRNA targets in protein coding sequences. *Bioinformatics*. 2012 Mar 15;28(6):771-6.
130. Fang, Z. and Rajewsky, N. (2011) The impact of miRNA target sites in coding sequences and in 3'UTRs. *PLoS One*, 6, e18067.
131. Yanagishita M. Proteoglycans and hyaluronan in female reproductive organs. *EXS*. 1994;70:179-90.
132. Duursma AM, Kedde M, Schrier M, le Sage C, Agami R. miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. *RNA*. 2008 May;14(5):872-7.
133. Takagi, S. et al. MicroRNAs regulate human hepatocyte nuclear factor 4alpha, modulating the expression of metabolic enzymes and cell cycle. *J. Biol. Chem.*, 2010 285, 4415–4422.

134. Schnall-Levin, M. et al. Conserved microRNA targeting in *Drosophila* is as widespread in coding regions as in 3'UTRs. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2010 107, 15751–15756.
135. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008 Oct 23;455(7216):1061-8.
136. Avraham R, Sas-Chen A, Manor O, Steinfeld I, Shalgi R, Tarcic G, Bossel N, Zeisel A, Amit I, Zwang Y, Enerly E, Russnes HG, Biagioni F, Mottolese M, Strano S, Blandino G, Børresen-Dale AL, Pilpel Y, Yakhini Z, Segal E, Yarden Y. EGF decreases the abundance of microRNAs that restrain oncogenic transcription factors. *Sci Signal*. 2010 Jun 1;3(124):ra43.
137. Opitz CA, Litzenburger UM, Sahm F, Ott M, Tritschler I, Trump S, Schumacher T, Jestaedt L, Schrenk D, Weller M, Jugold M, Guillemin GJ, Miller CL, Lutz C, Radlwimmer B, Lehmann I, von Deimling A, Wick W, Platten M. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*. 2011 Oct 5;478(7368):197-203.
138. Tsutomu Kume. The Role of FoxC2 Transcription Factor in Tumor Angiogenesis. *Journal of Oncology* Volume 2012 (2012), Article ID 204593, 7 pages.
139. Sheri L. Holmen, Bart O. Williams. Essential Role for Ras Signaling in Glioblastoma Maintenance. *Cancer Res* 2005; 65: (18).
140. Magrassi L, Conti L, Lanterna A, Zuccato C, Marchionni M, Cassini P, Arienta C, Cattaneo E. Shc3 affects human high-grade astrocytomas survival. *Oncogene*. 2005 Aug 4;24(33):5198-206.
141. Annenkov A. The insulin-like growth factor (IGF) receptor type 1 (IGF1R) as an essential component of the signalling network regulating neurogenesis. *Mol Neurobiol*. 2009 Dec;40(3):195-215.