

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
TOR VERGATA**
Facoltà di Medicina e Chirurgia

Scuola di Dottorato in Scienze Endocrinologiche
XX ciclo

Coordinatore: Prof. Gaetano Frajese

Tesi di Dottorato:

Ruolo di miR-221 e miR-222 in modelli cellulari
di adenocarcinoma prostatico

Docente guida
Prof.ssa Maria Giulia Farace

Candidato
Dr. Neri Mercatelli

INDICE

INTRODUZIONE

L'adenocarcinoma prostatico

- La prostata: struttura funzione ed organizzazione pag. 4
- Patologia molecolare dell'adenocarcinoma prostatico pag. 5
- Regolatori del ciclo cellulare ed oncogenesi del carcinoma prostatico pag. 8

I microRNA

- I microRNA pag. 15
- La biosintesi dei microRNA pag. 16
- Meccanismo d'azione e funzioni dei microRNA pag. 19
- MicroRNA e cancro pag. 22
- MicroRNA oncosoppressori pag. 25
- MicroRNA oncogeni pag. 27

SCOPO DEL LAVORO pag. 31

MATERIALI E METODI

Metodi

- Linee cellulari e tecniche di coltura pag. 33
- Tecniche di preparazione e manipolazione del DNA pag. 33
- Costruzione dei plasmidi pag. 34

- Saggio di attività della luciferasi pag. 35
- Trasfezioni pag. 35
- Silenziamento di p27 e knockdown dei microRNA pag. 36
- Crescita e sopravvivenza cellulare pag. 36
- Saggio di crescita indipendente dall'ancoraggio pag. 37
- Marcatura con bromodeossiridina e lettura al FACS pag. 38
- Estrazione del RNA e analisi per Northern Blot pag. 39
- Estrazione delle proteine e Western Blot pag. 40
- Xenotrapianto di cellule LNCaP pag. 41

Materiali

- Ceppi batterici pag. 42
- Terreni di coltura per batteri pag. 42
- Soluzioni per colture cellulari pag. 43
- Terreno di coltura cellulare per linee di PCa pag. 43
- Terreni di coltura per il saggio di crescita indipendente dall'ancoraggio (*Soft Agar Assay*) pag. 43
- Soluzioni per l'elettroforesi pag. 43
- Soluzioni per l'analisi Northern Blot pag. 44
- Composizione del lysis buffer pag. 44

RISULTATI

- I microRNA miR-221 e miR-222 sono espressi solamente nella linea cellulare PC3, mentre risultano assenti in cellule LNCaP e 22Rv1. La loro espressione è inversamente correlata a quella della proteina p27. pag. 45
- La sovraespressione di miR-221, miR-222 o entrambi, riduce i livelli di p27 nelle cellule LNCaP e 22Rv1, mentre la loro sottoregolazione incrementa l'espressione di p27 nelle cellule PC3. pag. 47
- I microRNA-221 e 222 interagiscono in maniera diretta con il 3'UTR del RNA messaggero di p27. pag. 51
- L'espressione ectopica di miR-221 e miR-222 aumenta la crescita delle cellule LNCaP e ne induce la progressione in fase S del ciclo cellulare. pag. 53
- L'espressione ectopica di miR-221 e/o miR-222 incrementa il potenziale clonogenico di cellule LNCaP, mentre la sottoespressione di entrambi i microRNA nelle cellule PC3 riduce sensibilmente la loro capacità clonogenica. pag. 56
- Cellule LNCaP stabilmente esprimenti il miR-221 inoculate per via sottocutanea in topi SCID, producono tumori sensibilmente più grandi dei tumori di controllo. pag. 60

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI pag. 64

BIBLIOGRAFIA pag. 71

INTRODUZIONE

L'ADENOCARCINOMA PROSTATICO

La prostata: struttura, organizzazione e funzione

La prostata è una ghiandola tubulo-alveolare che nel maschio si trova al di sotto della vescica e davanti al retto, circondando il collo della vescica e l'uretra nella quale secreta parte del fluido che trasporta gli spermatozoi durante l'eiaculazione. La ghiandola prostatica viene divisa in tre zone biologicamente e anatomicamente distinte: la regione periferica (PZ), la

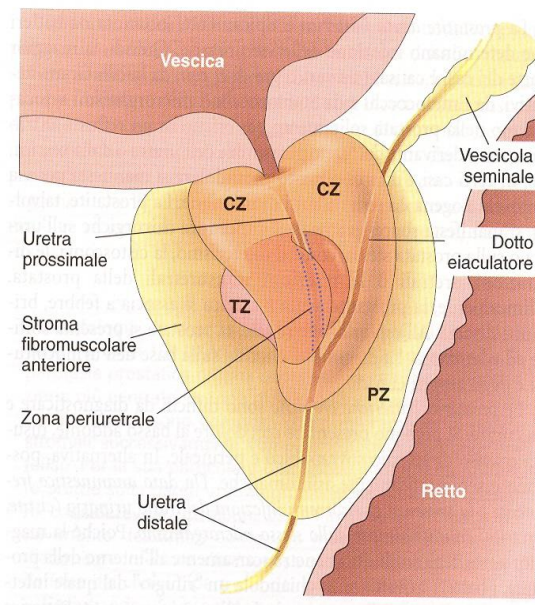


Figura 1. Anatomia della Prostata. Tratto da Robbins e Cotran *Le Basi Patologiche delle Malattie*, 2005.

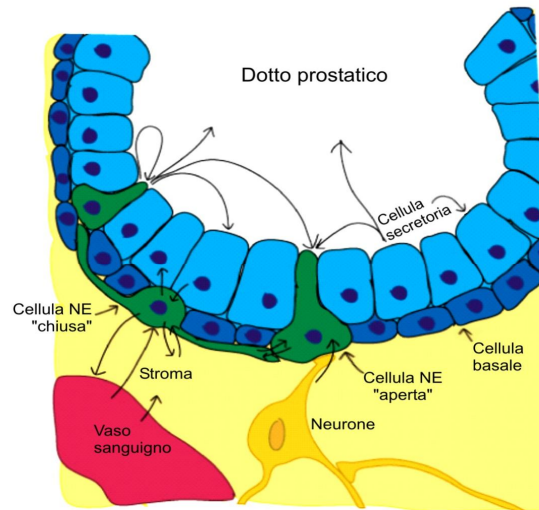
centrale (CZ) e quella di transizione (TZ) (Figura 1).

Ciascuna di queste zone è formata da una serie numerosa di dotti ed acini ghiandolari rivestiti da cellule epiteliali. L'epitelio ghiandolare prostatico è diviso in due strati: lo strato basale, vicino alla membrana basale, e lo strato di cellule secretorie (cellule luminali). Nello strato basale sono presenti le cellule staminali costituenti il compartimento proliferativo dell'epitelio prostatico; queste cellule, androgeno-indipendenti, danno origine ad un

tipo cellulare intermedio, le cellule di transizione pluripotenti e androgeno-responsive, che generano le cellule secretorie differenziate e probabilmente anche le cellule neuroendocrine (Isaacs e Coffey, 1989). Le cellule luminali, derivate da quelle di transizione, esprimono il recettore degli androgeni (AR) e sono dipendenti dalla stimolazione ormonale per la loro vitalità e attività secretoria; in assenza degli androgeni esse vanno incontro ad apoptosi

(Isaacs, 1999). L'epitelio ghiandolare è circondato da una membrana basale che lo separa dallo stroma fibromuscolare contenente cellule muscolari lisce AR-positive, fibroblasti, nervi, linfociti e macrofagi infiltrati e una rete vascolare capillare (Figura 2).

Figura 2. Organizzazione istologica della ghiandola prostatica. Sono mostrate le cellule epiteliali dello strato basale e dello strato secretorio, le cellule neuroendocrine (NE) e la componente stromale all'interno della quale si trovano terminazioni neuronali e vasi sanguigni. Si noti che non vi sono vasi all'interno del compartimento epiteliale.



Sviluppo e progressione del carcinoma prostatico

Il carcinoma della prostata (PCa) è nel mondo occidentale la più frequente neoplasia maschile e rappresenta la seconda causa di morte per neoplasia dopo il tumore del polmone (Cookson, 2001). Le cause principali dello sviluppo del cancro prostatico sono probabilmente riconducibili a fattori ambientali e genetici. Il tumore della prostata è tipicamente una malattia degli uomini di età superiore ai 50 anni, essendo il 75% delle diagnosi associato ad individui con età superiore ai 65 anni. Esiste anche una ben nota correlazione fra l'incidenza di tale neoplasia e differenze etniche e geografiche. Il cancro della prostata, molto raro nella popolazione Asiatica il cui tasso di mortalità è pari alla metà rispetto a quello degli uomini Caucasici, risulta essere al contrario molto frequente nella popolazione Afro-Americana. Tra i fattori di rischio probabilmente coinvolti nello sviluppo del carcinoma prostatico possono essere annoverati l'obesità ed il peso corporeo, diete ricche di grassi, il fumo di sigaretta, i livelli elevati di androgeni, ridotto apporto di vitamina E,

vitamina D e selenio, agenti infettivi trasmessi sessualmente e alterazioni genetiche. Sebbene sia chiaro che il carcinoma della prostata origina dal compartimento epiteliale, l'identificazione dello specifico sottotipo cellulare (androgeno dipendente, sensibile o indipendente) da cui origina il carcinoma non è ancora chiaro. Il modello tutt'oggi accettato è che in una delle popolazioni epiteliali (cellule staminali basali, cellule di transizione o cellule luminali) una cellula perda il controllo del proprio tasso di crescita originando un clone in attiva divisione che forma una lesione prostatica intraepiteliale (PIN). L'atrofia infiammatoria prostatica (PIA) viene considerata uno stadio precursore del PIN essendo solitamente osservata nella regione periferica della ghiandola prostatica in cui hanno origine la maggior parte dei carcinomi prostatici, e presenta un'instabilità cromosomica molto simile a quella osservata nel PIN e nelle cellule di carcinoma prostatico (Nelson *et al.*, 2003). Con l'accumulo di alterazioni geniche sempre maggiori, il PIN può accrescersi, diventando sempre più maligno fino a trasformarsi in un carcinoma vero e proprio (adenocarcinoma prostatico). Negli stadi iniziali il tumore prostatico è confinato alla ghiandola ed essendo, generalmente, caratterizzato da cellule a crescita molto lenta (Berges *et al.*, 1995), può restare asintomatico e non diagnosticato per anni. Successivamente, l'acquisita capacità migratoria delle cellule tumorali consente la loro diffusione anche in altre parti del corpo, portando alla formazione di metastasi soprattutto a livello linfonodale ed osseo (Figura 3).

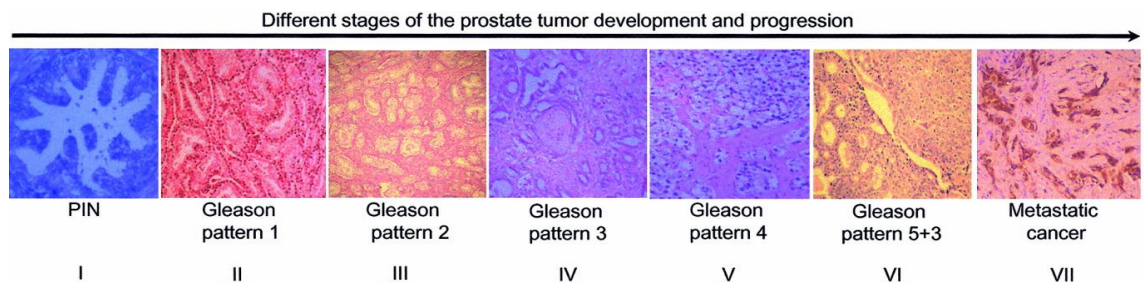


Figura 3. Stadi evolutivi di un carcinoma prostatico. Pannello I: lesione intraepiteliale (PIN) di alto grado. Dal pannello II al pannello VI sono mostrati tumori ben differenziati con grado di malignità (Gleason pattern) sempre più elevato; si noti che con il progredire del tumore si perde sempre di più la distinzione tra i dotti e si osserva una fusione delle strutture ghiandolari. Pannello VII: carcinoma prostatico con metastasi alle ossa. (Le sezioni istologiche sono colorate con ematossilina-eosina).

La caratteristica principale dello sviluppo del carcinoma prostatico è rappresentato dalla progressione dallo stadio iniziale di crescita dipendente dagli androgeni (androgeno-dipendenza) a quello avanzato, oramai irreversibile, di refrattarietà ormonale (androgeno-indipendenza). Sebbene negli ultimi anni la ricerca scientifica abbia prodotto un notevole sforzo nel tentativo di individuare le basi genetiche coinvolte in questo tipo di transizione, il meccanismo molecolare rimane ancora scarsamente conosciuto. Il recettore degli androgeni (AR) riveste sicuramente un ruolo fondamentale nella progressione del carcinoma prostatico, essendo la sua attivazione essenziale per le fasi iniziali della crescita tumorale. Infatti, inizialmente, la terapia ormonale basata sulla deprivazione dagli androgeni, attraverso castrazione chirurgica o chimica, produce una sensibile regressione del tumore causata dall'induzione dell'apoptosi nelle cellule ormone-responsive (Scott *et al.*, 1980; Denmeade *et al.*, 1996).

Sfortunatamente però la terapia ormonale diventa inefficace e la regressione del tumore quindi solo transiente, quando, inevitabilmente, le cellule neoplastiche iniziano a dividersi in modo indipendente dall'azione degli androgeni. Numerose evidenze suggeriscono un ruolo determinante del recettore degli androgeni anche durante lo stadio di androgeno-indipendenza; questa teoria è supportata dal fatto che l'espressione e l'attivazione di tali recettori sono state riscontrate nella maggior parte dei carcinomi androgeno-indipendenti. Inoltre, a carico di questi stessi recettori risultano essere presenti una serie di alterazioni raramente osservate nei tumori androgeno-dipendenti. Questi cambiamenti che comprendono amplificazioni, mutazioni puntiformi e variazione dell'espressione di proteine coregolatrici, convergono verso l'identificazione di un "super recettore degli androgeni" che è in grado di rispondere sia a basse concentrazioni di androgeni che ad un gran numero di ligandi agonisti (Taplin and Balk, 2004). Sembra inoltre evidente che in questo stadio avanzato i recettori degli androgeni possano essere attivati in maniera ligando-indipendente da fattori di crescita o citochine come ad esempio il *fattore di crescita insulina simile* (IGF-1), il *fattore di*

crescita epidermico (EGF) e le interleuchine 1 e 6 (Taplin and Balk, 2004; Ueda *et al.*, 2002).

L'insorgere di tutte queste alterazioni a carico dei recettori degli androgeni produce, da parte delle cellule tumorali, una risposta in termini di crescita alternativa a quella dipendente dagli androgeni, rendendo la terapia ormonale inefficace.

La conseguenza naturale al fallimento di tale terapia viene rappresentata dalla prostatectomia radicale con le sue ovvie ripercussioni a livello psicologico sul paziente.

In ambito scientifico è quindi cresciuta l'attenzione verso alternative terapeutiche che consentano di debellare il tumore con complicazioni ed effetti collaterali minori.

Ci sono almeno tre possibili approcci per cercare di bloccare la crescita delle cellule tumorali a prescindere dalla loro dipendenza dagli androgeni. Il primo è stimolare il sistema immunitario dell'ospite ad indurre una risposta citotossica antitumorale (Morris and Scher, 2002); il secondo è bloccare farmacologicamente le vie di trasduzione del segnale intracellulari al fine di inibire la sintesi del DNA e quindi il ciclo cellulare delle cellule neoplastiche (si veda la completa "*review*" di Morris and Scher, 2000).

Il terzo approccio è bloccare la neo-angiogenesi tumorale, ossia la formazione di nuovi vasi sanguigni a partire da vasi pre-esistenti, necessaria allo sviluppo di tutti i tumori solidi tra cui anche il tumore della prostata (Jimenez *et al.*, 2006).

Patologia molecolare dell'adenocarcinoma prostatico

Come è stato precedentemente accennato, tra i fattori di rischio per la progressione del carcinoma prostatico, spicca una gran varietà di alterazioni genetiche che, associata alla componente epigenetica ed ambientale, fornisce le basi essenziali per lo sviluppo di tale neoplasia.

L'individuazione dei polimorfismi genici associati a questa malattia potrebbe rappresentare un passo importante nella comprensione dei pathway molecolari coinvolti nel processo di carcinogenesi della prostata, ed allo stesso tempo gettare le basi per lo sviluppo futuro di nuove applicazioni cliniche.

Sebbene nella ricerca biomolecolare la recente diffusione di nuove metodologie scientifiche come la tecnica del *microarray* o le applicazioni di *proteomica* abbia contribuito enormemente alla comprensione della funzione di proteine coinvolte nella biologia tumorale, risulta ancora molto difficile individuare e classificare quelle alterazioni genetiche che caratterizzano in maniera specifica il carcinoma prostatico. Questo sembra essere in parte dovuto alla marcata eterogeneità e natura multifocale di questa specifica neoplasia (Konishi *et al.*, 2005). Morfologicamente infatti, il carcinoma della prostata presenta non solo una sensibile eterogeneità del grado istologico nei singoli tumori, ma anche un'ostogenesi multifocale nello stesso organo prostatico. In alcuni casi, questa eterogeneità potrebbe essere il risultato di una tumorigenesi multifocale, originata da tumori multifocali di vario grado che, con il passare del tempo, si fondono a formare una lesione unica (Konishi *et al.*, 2005). Per questo motivo è anche molto complicato distinguere a livello molecolare le forme di carcinoma ereditarie da quella sporadiche.

Il numero di loci genetici coinvolti nella carcinogenesi prostatica sembra essere molto ampio. Approcci citogenetici di *ibridazione in situ per fluorescenza* (FISH) o di *ibridazione genomica comparativa* (CGH) hanno rivelato una serie consistente di anomalie cromosomiche che alterano l'espressione di geni correlati con la progressione e lo sviluppo tumorale.

Limitate sono le informazioni relative al coinvolgimento di oncogeni nel carcinoma prostatico; fra questi spiccano c-myc, ras, c-ErbB2 e Bcl-2. L'overespressione del noto attivatore trascrizionale c-myc è stata correlata con il grado di Gleason del tumore, mentre

quella della proteina antiapoptotica Bcl-2 è presente in circa la metà dei tumori ed in particolare in quelli androgeno-indipendenti e metastatici (McDonnell *et al.*, 1992).

Al contrario, sembrano essere molto numerose le evidenze sul coinvolgimento di oncosoppressori, il cui prodotto genico può essere alterato da mutazioni, delezioni, riarrangiamenti, ipermetilazione dei promotori ed aploinsufficenze.

Infatti, una delle più comuni alterazioni genetiche di questa patologia riguarda proprio un noto oncosoppressore, il gene per la glutatione S-transferasi (GSTP1), la cui inattivazione, causata dall'ipermetilazione del suo promotore, è stata riscontrata in più del 90% dei casi (Millar *et al.*, 1999).

La mancanza di espressione di PTEN (*Phosphatase and tensin homologue*) in linee cellulari di carcinoma della prostata (Vlietstra *et al.*, 1998) risulta essere spesso frequente anche nei carcinomi associati a stadi di sviluppo avanzati (Suzuki *et al.*, 1998; Vivanco *et al.*, 2002). Il gene per PTEN codifica per una fosfatasi che agisce da regolatore negativo della via di trasduzione del segnale della fosfoinositol 3 chinasi B (PI3-K Akt) essenziale per la progressione del ciclo cellulare e per il mantenimento della sopravvivenza cellulare (Sun *et al.*, 1999).

La perdita del braccio corto del cromosoma 8, che sembra essere un evento precoce della neoplasia prostatica, causa la scomparsa dell'oncosoppressore NKX3.1. Questa proteina, essenziale per il normale sviluppo dell'organo prostatico, assume un notevole interesse perché è in grado di legarsi al DNA e reprimere l'espressione del gene PSA (*prostate specific antigen*) (Chen *et al.*, 2002). La sua perdita, dunque, potrebbe essere coinvolta nell'incremento della concentrazione di PSA osservata nella progressione del tumore della prostata.

Sebbene in letteratura ci siano risultati contrastanti, sembrerebbe che anche il gene per l'oncosoppressore retinoblastoma (Rb), la cui deregolazione è stata associata con un'ampia varietà di carcinomi umani, possa giocare un ruolo importante nella carcinogenesi della

prostata; infatti è stato recentemente dimostrato che in modelli animali di topi la sua inattivazione causa un incremento del tasso proliferativo dell'epitelio prostatico con un fenotipo assimilabile a quello della neoplasia intraepiteliale prostatica (PIN) (Hill *et al.*, 2005; Maddison *et al.*, 2004).

È ormai noto che le mutazioni a carico di p53, il più famoso fra gli oncosoppressori, siano rare nei carcinomi primari, ma molto comuni nei tumori di alto grado associati a stadi avanzati dello sviluppo come per esempio all'androgeno-indipendenza o alle metastasi ossee (Bookstein *et al.*, 1993; Dinjens *et al.*, 1994).

Regolatori del ciclo cellulare ed oncogenesi del carcinoma prostatico

Un ruolo chiave nella patogenesi prostatica è svolto dall'alterazione di proteine coinvolte nel ciclo cellulare e soprattutto di quelle deputate alla regolazione delle chinasi ciclina dipendenti (CDKs). Queste ultime sono una famiglia di serin/treonin chinasi che, fosforilando specifiche proteine nucleari, assumono un ruolo centrale nel controllo ordinato della progressione tra le varie fasi del ciclo cellulare (Pestell *et al.*, 1999). La loro attività viene regolata mediante fosforilazione causata dall'interazione con subunità regolatorie positive, meglio conosciute come cicline (Pestell *et al.*, 1999; Sherr *et al.*, 1996), o in maniera negativa con gli inibitori delle chinasi ciclina dipendenti (CKI) (Sherr *et al.*, 1999) (Fig. 4). È stato osservato il coinvolgimento di alcune cicline nella progressione del carcinoma prostatico. Per esempio la ciclina di tipo D, coinvolta nella transizione dalla fase G1 ad S del ciclo cellulare, è stata associata a tumori derivati da metastasi ossee (Drobnjak *et al.*, 2000) e la sua overespressione aumenta la crescita e la tumorigenicità della linea cellulare androgeno-dipendente derivata da metastasi linfonodale LNCaP (Chen *et al.*, 1998). Recenti evidenze supportano anche il fatto che l'aumento dei livelli di ciclina D1 causi,

mediante inibizione di CDK6, la sottoespressione del recettore degli androgeni e possa essere dunque responsabile della resistenza alla terapia androgeno ablativa (Petre-Draviam *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2005).

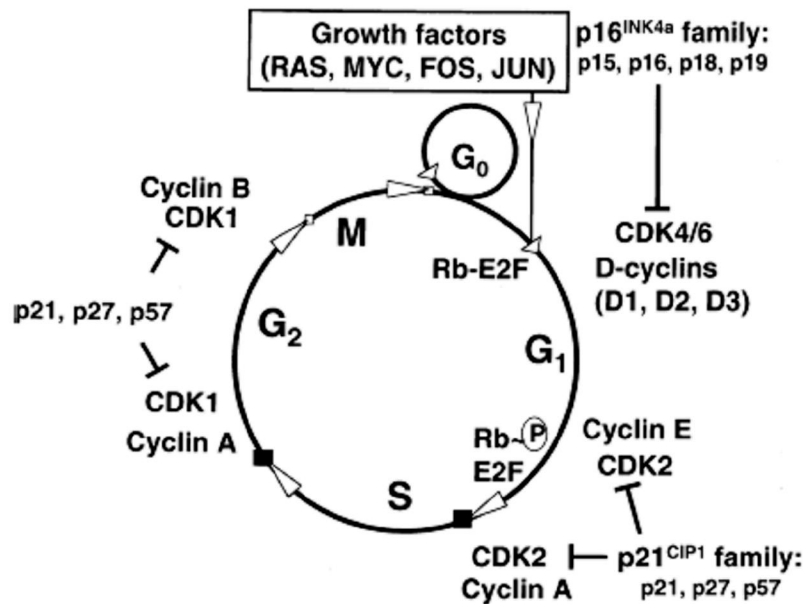


Figura 4. La regolazione del ciclo cellulare. Per la progressione controllata nelle varie fasi del ciclo cellulare è richiesta un'associazione coordinata fra le specifiche cicline e le chinasi ciclina dipendenti: il complesso ciclina D-CDK4/6 agisce nella fase G₁, ciclina E-CDK2 e ciclina A-CDK2 nella transizione tra G₁ e fase S, mentre ciclina A o B-CDK1 in quella G₂/M (Sherr *et al.*, 1996; Del Sal *et al.*, 1996).

Anche alcune alterazioni a livello degli inibitori delle chinasi ciclina dipendenti (CKI) sono state spesso associate con la neoplasia prostatica. Fra queste spiccano le mutazioni del gene CDKN2 (p16), riscontrate frequentemente in tumori metastatici (Jarrard *et al.*, 1997; Gu *et al.*, 1998), e quelle osservate in p21 (Gao *et al.*, 1995), la cui espressione potrebbe essere coinvolta nella comparsa di recidive (Aaltomaa *et al.*, 1999); tuttavia le più interessanti nello studio della biologia tumorale risultano essere quelle correlate all'espressione del gene CDKN1B, che codifica per p27 Kip1.

Questo ultimo esercita la sua azione molecolare inibendo l'attività dei complessi delle chinasi ciclina-dipendenti 2 con le cicline E ed A, regolando così negativamente la transizione dalla

fase G1 alla fase S del ciclo cellulare. I livelli di p27, normalmente abbondanti nelle cellule quiescenti, subiscono una rapida diminuzione in seguito a stimoli mitogeni, causando l'entrata nella fase S del ciclo cellulare. Questa caratteristica conferisce a p27 un ruolo determinante nella regolazione della proliferazione cellulare (Kiyokawa *et al.*, 1996), del differenziamento (Casaccia-Bonnel *et al.*, 1997) e della trasformazione maligna (Nakayama *et al.*, 1996). Infatti una diminuzione dei suoi livelli di espressione, che risulta in una perdita del normale tasso di crescita cellulare, è stata riscontrata in molti tipi di tumori quali ad esempio quello della mammella, quello gastrico, polmonare, esofageo e coloretale (Sgambato *et al.*, 2000; Kawamata *et al.*, 1995; Slingerland and Pagano, 2000) rendendolo nella maggior parte dei casi un indicatore di prognosi infausta.

La riduzione dei livelli di p27 è stata anche più volte associata alla neoplasia della prostata come ad esempio nell'iperplasia prostatica benigna, nella neoplasia intraepiteliale prostatica e nel carcinoma prostatico conclamato (Yang *et al.*, 1998), ed è stata correlata con il fallimento della terapia antiormonale, con un elevato grado del punteggio di Gleason e con uno stadio aggressivo di metastatizzazione (Yang *et al.*, 1998; Lloyd *et al.*, 1999). Tutte queste evidenze hanno suggerito un possibile ruolo per p27 come marcatore molecolare di cancro prostatico maligno (Tsihlias *et al.*, 1998).

Le mutazioni a carico del gene per p27 sono però molto rare: ci sono scarse evidenze sulla perdita di espressione per delezione della regione cromosomiale 12p12-3 su cui il gene stesso mappa, ma è invece ormai accertato che la regolazione dei suoi livelli di espressione sia principalmente dovuta all'azione di meccanismi post-trascrizionali (Loda *et al.*, 1997).

Fra questi, fino ad oggi, il più caratterizzato risulta essere quello della degradazione mediata dal proteasoma, che è fortemente acceso in molti tipi di cancro (Alkarain *et al.*, 2004) per opera dell'attivazione oncogenica di vari recettori tirosin chinasi e di vie di trasduzione del segnale.

La proteolisi di p27 sembra comprendere due meccanismi d'azione temporalmente coordinati fra loro, che agiscono insieme nel promuovere la scomparsa di p27 richiesta per l'entrata in fase S del ciclo cellulare (Alkarain *et al.*, 2004). Il primo dei due inizia ad agire in risposta a stimoli mitogeni nelle fasi iniziali di G1, causando, tramite fosforilazione di un residuo serinico specifico (Ser 10) di p27, la degradazione mediata dall'esportazione della proteina stessa nel citoplasma (Bohem *et al.*, 2002). Di conseguenza, il risultante abbassamento dei livelli intranucleari di p27 causa un ovvio incremento di attivazione del complesso ciclina E-CDK2. Quest'ultimo a sua volta agisce nella fase tardiva di G1 ed in S, fosforilando lo specifico residuo treoninico 187 di p27, permettendone il riconoscimento da parte del complesso multifattoriale SCF che media l'ubiquitinazione e la degradazione ad opera del proteasoma 26S (Sheaff *et al.*, 1997; Vlach *et al.*, 1997; Pagano *et al.*, 1995; Tsvetkov *et al.*, 1999; Ganoth *et al.*, 2001).

I microRNA

I microRNA

I microRNA (miRNA) sono un'ampia classe di piccoli RNA non codificanti (21-25 nucleotidi) che regolano negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale (He and Hannon, 2004) mediante appaiamento con specifici RNA messaggeri (mRNA), inducendone la degradazione o impedendone la traduzione nel corrispondente prodotto proteico (Kim, 2005; Petersen *et al.*, 2006).

Le prime evidenze sull'esistenza dei microRNA risalgono al 1993 quando il gruppo di Victor Ambros identificò, mediante *screening* genetico di geni alla base di difetti nel controllo temporale dello sviluppo post-embryonale del nematode *C. elegans*, un piccolo RNA non codificante di 22 nucleotidi, chiamato lin-4. Quest'ultimo risultava essere parzialmente complementare con sette nucleotidi conservati nella regione 3' non tradotta del mRNA del gene che codifica per la proteina nucleare LIN-14 (Lee *et al.*, 1993), la cui sottoespressione è essenziale per la corretta progressione temporale dal primo al secondo stadio di sviluppo larvale. L'evidenza della complementarietà di sequenze fra lin-4 e lin-14, unita al fatto che mutazioni a carico di lin-4 fossero in grado di alterare il corretto andamento dello sviluppo, ispirò una serie numerosa di studi molecolari e biochimici che condussero alla dimostrazione che l'interazione diretta fra i due RNA è responsabile del controllo dell'espressione della proteina LIN-14 (Ha *et al.*, 1996; Wightman *et al.*, 1993). Mediante un analogo meccanismo fu scoperto che lin-4 era in grado di regolare negativamente anche il gene lin-28 coinvolto in uno stadio più avanzato dello sviluppo larvale di *C. elegans* (Moss *et al.*, 1997). Questi risultati condussero all'identificazione di un meccanismo completamente nuovo di regolazione genica post-trascrizionale coinvolto nei processi di sviluppo. Dopo questa scoperta i microRNA sono stati individuati anche negli animali e nelle piante; è ormai accertato che tutti gli eucarioti multicellulari, e perfino qualche unicellulare, si avvalgono

dell'espressione di questi piccoli RNA nella regolazione dell'espressione genica (Kent and Mendell, 2006).

Nell'uomo sono stati fino ad oggi identificati più di 400 microRNA ma le ricerche informatiche suggeriscono che il numero totale possa addirittura superare le mille unità (Bentwich *et al.*, 2005; Berezikov *et al.*, 2005). Questa evidenza, correlata alla loro natura regolatoria, conferma il fatto, oggi supportato anche da numerosi dati sperimentali, che i microRNA possano agire non solo nello sviluppo ma nella maggior parte dei processi fisiologici della cellula quali ad esempio la crescita cellulare, la divisione cellulare, l'apoptosi ed il differenziamento.

La biosintesi dei microRNA

Il processo che conduce alla formazione dei microRNA maturi è stato recentemente chiarificato (Figura 5). I geni per i microRNA possono essere localizzati nel genoma singolarmente o in *cluster*, in regioni intergeniche o addirittura, come suggeriscono numerose evidenze, nelle sequenze introniche di specifici geni (Rodriguez *et al.*, 2004).

I geni per i microRNA sono generalmente trascritti nel nucleo dalla RNA polimerasi II (Pol II) in lunghi precursori, i pri-miRNA. Questi ultimi vengono processati da un'endonucleasi (RNasi di tipo III) Drosha, e dal suo cofattore DGCR-8 (Pasha in *Drosophila*), per formare un trascritto di circa 70 nucleotidi chiamato pre-miRNA che consiste di una struttura a forcina imperfetta. Drosha è prevalentemente localizzata nel nucleo e presenta due domini sequenziali con attività di RNasi III, un dominio di legame per gli RNA a doppio filamento e un segmento N-terminale a funzione ancora ignota (Lee *et al.*, 2003). Sebbene il meccanismo mediante il quale Drosha riesca a discriminare i differenti precursori dei microRNA sia ancora sconosciuto, stanno sempre più prendendo piede le evidenze che sia proprio la

struttura del pri-microRNA la responsabile di questo riconoscimento. Infatti l'efficienza del processamento da parte di Drosha dipende dalla grandezza dell'ansa terminale, dalla struttura della forcina e dalle sequenze fiancheggianti il sito riconosciuto di taglio, poiché è stato osservato che mutazioni che alterano le caratteristiche di queste regioni inducono in maniera significativa l'inibizione della sua attività (Zeng *et al.*, 2003).

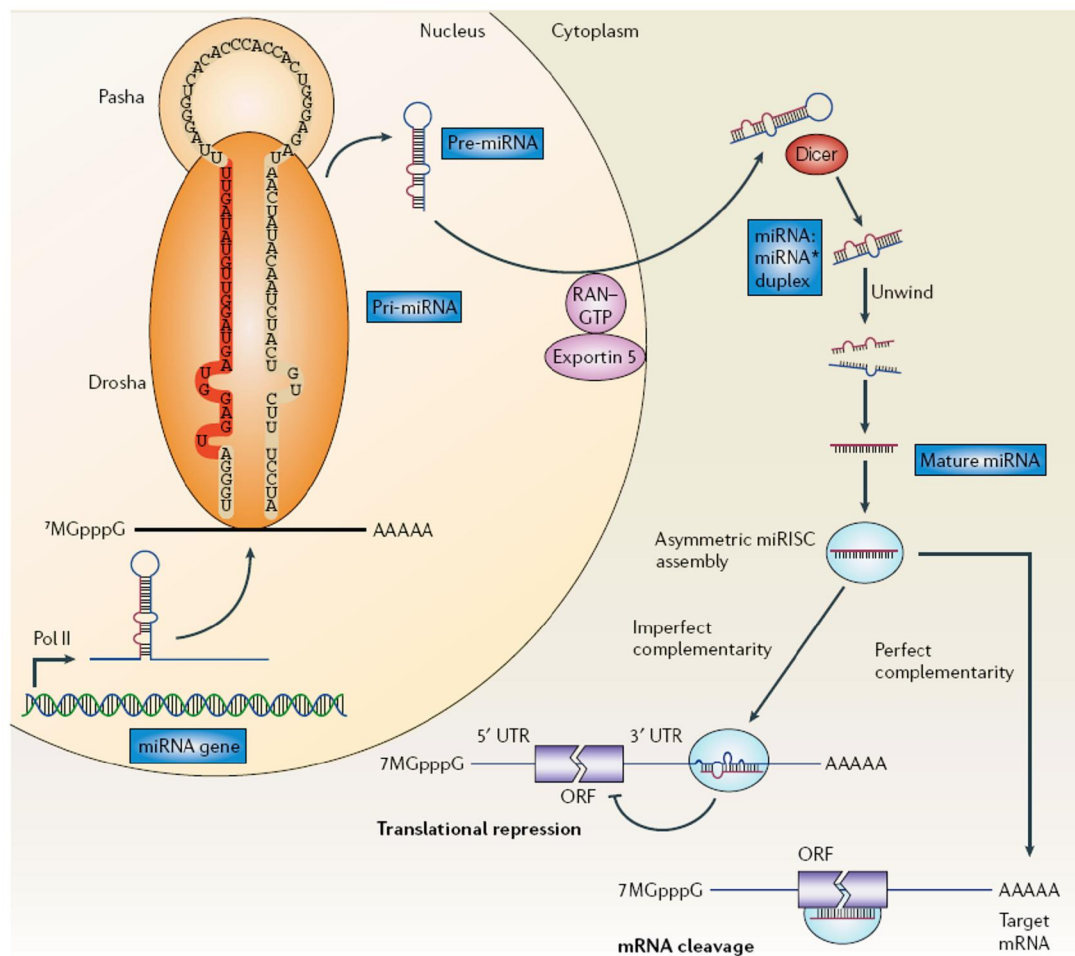


Figura 5. La biogenesi dei microRNA.

Dopo questo passaggio iniziale, il pre-microRNA viene esportato ad opera del trasportatore della famiglia delle RAN-GTPasi Esportina 5 (Exp5), dal nucleo verso il citoplasma dove

un'altra RNasi di tipo III, Dicer, ne catalizza un ulteriore processamento che conduce alla formazione di un piccolo (circa 22 nucleotidi) RNA a doppio filamento imperfetto (duplex) (miRNA:miRNA*) contenente sia il filamento del microRNA maturo (miRNA) che il suo complementare (miRNA*) (Hannon *et al.*, 2004). La proteina Dicer, di circa 200 KDa, contiene due domini, RIIIa e RIIIb, ad attività RNasica, un dominio con attività ATPasica ed elicasica, un dominio DUF283 a funzione ancora ignota, un dominio C-terminale di legame con gli RNA duplex ed un dominio PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille). Quest'ultimo risulta essere fondamentale nel riconoscimento dell'estremità 3' protudente generata dal taglio catalizzato da Drosha (Lingel *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2003) e potrebbe inoltre essere il responsabile del corretto posizionamento della regione ad attività RNasica di Dicer sul sito di taglio del pre-microRNA (Figura 6) (Carmell and Hannon, 2004).

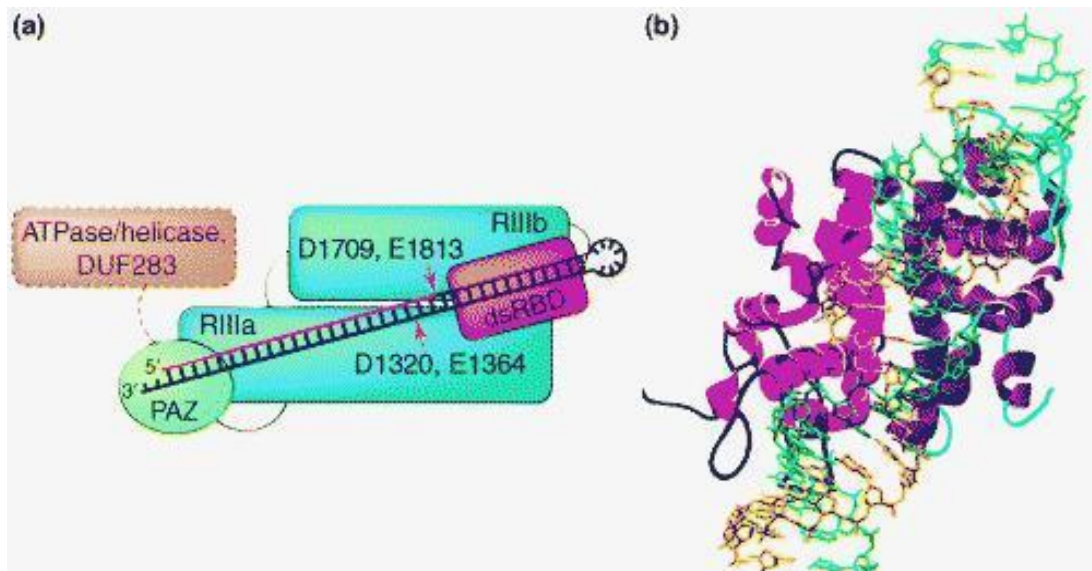


Figura 6. Struttura dell'RNasi tipo III Dicer. a) Schema che riassume un possibile meccanismo del processamento del pre-microRNA da parte di Dicer. Il posizionamento dei domini RIII dimostra la simmetria della regione catalitica, con RIIIa che taglia il braccio discendente ed RIIIb quello ascendente del pre-microRNA (freccie rosse). b) Modello di interazione dell'RNasi III di batterio (*Aquifex aeolicus*) con RNA a doppio filamento. Questa interazione potrebbe essere molto simile a quella di Dicer. Tratto da Filipowicz *et al.*, 2005.

L'ultimo stadio della formazione dei microRNA richiede l'intervento di RISC (*RNA induced-silencing complex*), il complesso multiproteico che induce il silenziamento del

RNA. La selezione del RNA messaggero bersaglio specifico e l'efficienza funzionale di un microRNA, richiedono che il filamento maturo del microRNA, proveniente dal duplex miRNA:miRNA*, sia selettivamente incorporato nel complesso RISC (Schwarz *et al.*, 2003; Khvorova *et al.*, 2003). Il filamento complementare miRNA* viene, al contrario, rapidamente degradato. Sebbene i microRNA maturi possano risiedere su entrambi i filamenti del RNA duplex, è stato osservato che l'incorporazione preferenziale in RISC di uno rispetto all'altro, è principalmente dovuta all'instabilità relativa dell'estremità 5' ovvero viene scelta come microRNA attivo e maturo, la molecola dotata di minore stabilità alla sua estremità 5'. Sono dunque le proprietà termodinamiche del microRNA precursore a determinare l'assemblaggio asimmetrico di RISC e di conseguenza, la specificità del mRNA bersaglio durante il meccanismo di inibizione post-trascrizionale (He and Hannon, 2004).

Meccanismo d'azione e funzioni dei microRNA

Come è stato accennato precedentemente, il complesso RISC è formato da una serie di proteine, fra le quali spiccano quelle della famiglia Argonauta (Bernstein *et al.*, 2001). Queste ultime presentano due domini caratteristici conservati: il dominio PAZ, presente anche in Dicer, ed il dominio Piwi. Il dominio PAZ, sia in *H. Sapiens* (hAgo2) che in *Drosophila*, contiene un sito di legame per gli acidi nucleici (OB) come mostrato nella figura 7a, mentre Piwi, considerata la sua omologia strutturale con la RNasi H, sembrerebbe essere imputato nel processo di taglio del mRNA bersaglio (Song *et al.*, 2004).

Il meccanismo mediante il quale il complesso RISC-microRNA induce il suo effetto regolatorio di silenziamento del RNA messaggero, viene esplicito secondo una doppia modalità di azione che consiste nella degradazione del mRNA stesso o nell'inibizione della

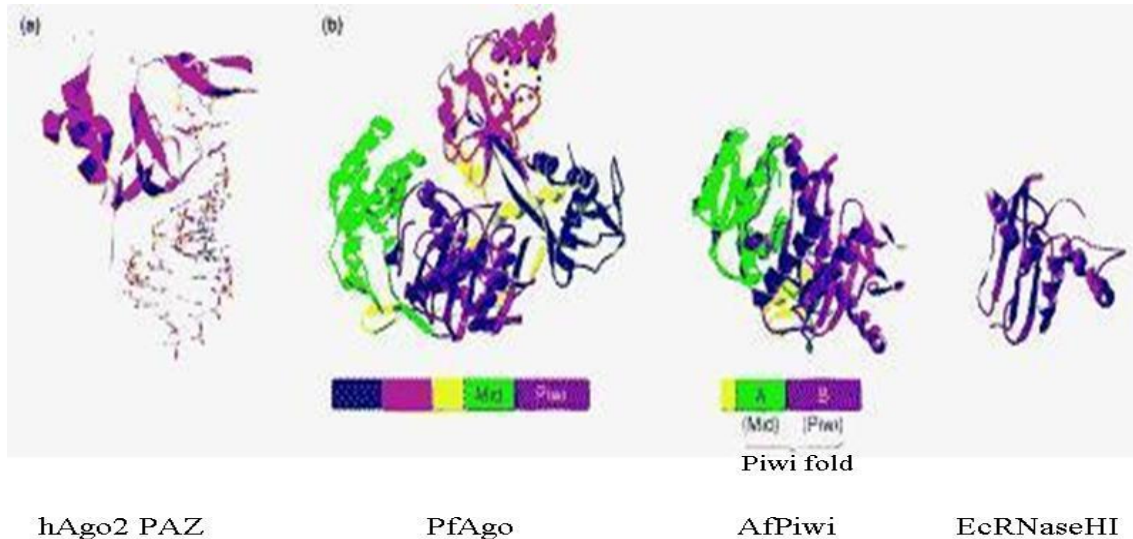


Figura 7. Struttura delle proteine Argonata. **a)** Struttura del dominio PAZ di Ago2 di *H. sapiens* in un complesso con dsRNA di 7 bp. Il dominio PAZ assomiglia ad un ripiegamento OB (di legame ad acidi nucleici). **b)** Strutture proteiche di PfAgo, AfPiwi e EcRNAasiHI. Tratto da Filipowicz et al., 2005.

sua traduzione. Questo dipende dal grado di complementarietà fra la sequenza del microRNA e quella del suo specifico bersaglio (Figura 5). Infatti, i microRNA che si legano con complementarietà perfetta ai loro RNA messengeri *target*, ne determinano la degradazione; in questo caso è presente un solo sito di appaiamento che generalmente si trova sulla ORF (open reading frame) o sequenza codificante del mRNA bersaglio. Questa modalità di azione omologa a quella dell'RNA interferente (RNA interference), viene comunemente riscontrata nelle piante (Hake, 2003). Al contrario, negli animali, eccetto poche eccezioni come ad esempio quella del miR-196 (Yekta *et al.*, 2004), i microRNA, appaiandosi in maniera imperfetta con sequenze specifiche delle regioni non tradotte al 3' (3'UTR) dei loro messengeri *target*, ne inducono l'inibizione della traduzione (He and Hannon., 2004; Doench *et al.*, 2004). In questo tipo di regolazione, è stato osservato che la sequenza dei primi 7-8 nucleotidi che si trovano al 5' del microRNA, meglio conosciuta come *seed sequence*, si appaia in maniera perfettamente complementare con il sito sul

3'UTR del mRNA bersaglio, e che questo appaiamento è fondamentale per il corretto funzionamento dell'azione del microRNA.

Per la caratterizzazione funzionale di un microRNA risulta essere determinante l'identificazione accurata del suo o dei suoi mRNA bersagli. Il fatto che negli animali, i microRNA conducano la loro azione tramite complementarità perfetta solamente dei nucleotidi 2-7 o 2-8 della *seed sequence*, complica notevolmente lo studio per l'individuazione dei geni bersaglio di ogni microRNA, poichè una sequenza così corta potrebbe teoricamente essere complementare ad un numero enorme di sequenze nei 3'UTR di tutto il genoma, conducendo all'identificazione di molti falsi positivi.

Per cercare di ridurre ed indirizzare correttamente questo studio, negli ultimi anni, sono stati sviluppati una serie di programmi di predizione bioinformatica basati su algoritmi matematici, come ad esempio TargetScan, PicTar e Miranda che identificano gli ipotetici mRNA target di ogni specifico microRNA. Questi supporti informatici, accessibili in rete (www.targetscan.org, <http://pictar.bio.nyu.edu/http://>, www.microrna.org/microrna/searchMirnas.do), tengono in considerazione oltre che la complementarità, alcuni parametri importanti come la conservazione evolutiva fra varie specie e la stabilità termodinamica dell'eteroduplex formatosi dall'interazione fra microRNA e 3'UTR; anche se il target deve essere sempre successivamente validato da specifiche metodologie sperimentali, questo tipo di analisi rappresenta certamente il primo passo nello studio del ruolo funzionale di un microRNA.

Proprio mediante l'utilizzo della predizione bioinformatica è stato stimato che per ciascun microRNA potrebbero esistere addirittura più di duecento differenti geni bersaglio, che includono fattori di trascrizione, proteine secrete, recettori, trasportatori e regolatori di vie intracellulari. Questa enorme variabilità suggerisce che i microRNA possano essere coinvolti in quasi tutti i processi fisiologici della cellula, definendo un controllo regolatorio su circa un terzo degli RNA messaggeri di tutto il genoma umano (Esquela-Kerscher and Slack, 2006).

MicroRNA e cancro

Fra i processi biologici in cui è stato dimostrato il coinvolgimento dei microRNA ne spiccano alcuni, quali ad esempio l'apoptosi, il differenziamento e la proliferazione cellulare (Bartel 2004; Harfe 2005), la cui alterazione risulta essere frequentemente associata all'insorgenza ed allo sviluppo della patologia tumorale. Negli ultimi anni, numerosi gruppi di ricerca hanno osservato cambiamenti del profilo di espressione di microRNA singoli o in cluster in vari tipi di tumore, come nel linfoma di Burkitt, nel cancro del colon retto, nel cancro del fegato, nel cancro della mammella, nel carcinoma papillo-tiroideo, nel carcinoma epatocellulare e nel glioblastoma (Metzler *et al.*, 2004; Michael *et al.*, 2003; Takamizawa *et al.*, 2004; Iorio *et al.*, 2005; He *et al.*, 2005; Murakami *et al.*, 2006; Chan *et al.*, 2005; Ciafrè *et al.*, 2005). Tutte queste evidenze hanno non solo suggerito che i microRNA siano direttamente coinvolti nello sviluppo e progressione tumorale ma hanno anche stimolato gran parte del mondo scientifico nella ricerca sia delle cause che delle conseguenze biologico funzionali dell'espressione cancro-specifica dei microRNA. Infatti una più ampia delucidazione dei meccanismi molecolari che agiscono a valle ed a monte potrebbero risultare di notevole interesse per lo sviluppo di possibili future strategie diagnostiche e terapeutiche per la cura dei tumori.

Le cause della deregolazione dell'espressione dei microRNA nello sviluppo tumorale sembrano ancora scarsamente conosciute e probabilmente possono essere imputate ad una serie di alterazioni che agirebbero singolarmente o insieme. Fino ad oggi sono stati descritti almeno tre differenti meccanismi che comprendono la colocalizzazione di geni codificanti per microRNA e regioni genomiche associate al cancro, la regolazione epigenetica e l'alterazione di proteine coinvolte nel processamento e nella biogenesi dei microRNA (Calin and Croce, 2006). Più della metà dei geni che trascrivono per i microRNA risiedono in particolari regioni genomiche che, nelle cellule cancerose, sono spesso soggette ad alterazioni (Calin *et al.*, 2004); possono comprendere regioni di LOH (*loss of heterozygosity*,

perdita di eterozigotità) che contengono geni onco-soppressori, regioni di amplificazione che potrebbero contenere oncogeni, regioni comuni di rottura dei cromosomi e siti fragili (FRA). I FRA rappresentano siti preferenziali di scambio fra cromatidi fratelli, traslocazioni, delezioni, amplificazioni e integrazione di plasmidi a DNA e virus associati al tumore come quello del papilloma umano (HPV). Recenti evidenze hanno anche dimostrato un'associazione fra gli eventi epigenetici e l'espressione dei microRNA; ad esempio Scott e collaboratori hanno mostrato che nelle cellule del carcinoma mammario l'inibizione dell'istone deacetilasi causa una ampia variazione dei livelli dei microRNA (Scott *et al.*, 2006). Inoltre uno studio condotto dal gruppo di Saito ha evidenziato tramite microarray che fra i microRNA sovraespressi in cellule di cancro della vescica sottoposti a trattamenti con 5-aza-2'-deossicitidina e l'inibitore dell'istone deacetilasi acido 4-fenilbutirrico spicca il miR-127. Il gene codificante per questo microRNA è localizzato all'interno di un'unica CpG in una regione coinvolta in molti tipi di traslocazioni identificate nei tumori del sistema ematico e deleta per LOH nei tumori solidi. La riduzione della metilazione del DNA nei dintorni del sito d'inizio della trascrizione causa la sovraespressione di questo specifico microRNA che potrebbe avere un effetto anticancerogeno poiché è coinvolto nella repressione diretta del fattore antiapoptotico BCL-6 (Saito *et al.*, 2006).

Le alterazioni delle proteine che fanno parte del macchinario coinvolto nella biosintesi dei microRNA producono effetti drammatici sull'espressione dei microRNA, ed infatti è stato osservato che la mancanza del processamento da parte di Drosha potrebbe spiegare la sottoespressione dei microRNA osservata in molti tumori primari (Thomson *et al.*, 2006). Anche la riduzione di Dicer nel tumore del fegato è stata associata con una cattiva prognosi e una ridotta sopravvivenza post-operatoria dei pazienti affetti da tale neoplasia (Harris *et al.*, 2005; Karube *et al.*, 2005), indicando che Dicer potrebbe essere in grado di prevenirne la trasformazione maligna. Le proteine Argonata che, come è stato detto precedentemente, sono componenti cruciali del complesso RISC, sono state correlate con lo sviluppo di molti

tipi di cancro. Tre geni di questa famiglia, AGO3, AGO1 e AGO4, che si trovano in cluster sul cromosoma 1, sono spesso deleti nei tumori di Wilms del rene e vengono frequentemente associati con i tumori del neuroectoderma (Nelson *et al.*, 2003). Un altro gene della famiglia, HIWI1, che è l'ortologo umano del gene piwi di *Drosophila melanogaster*, mappa nella regione genomica 12q24.33, che è un locus associato con il tumore delle cellule germinali testicolari (Qiao *et al.*, 2002). Questo gene la cui espressione è specifica del testicolo, è stato trovato sovraespresso in circa il 75% dei seminomi testicolari, che sono tumori derivati da cellule germinali embrionali. Queste evidenze indicano che HIWI potrebbe avere un'attività oncogena e potrebbe normalmente funzionare nel controllo della proliferazione ed il mantenimento delle cellule germinali.

Solamente una piccola parte dei microRNA fino ad oggi identificati è stata associata con il proprio specifico ruolo biologico. Fra questi, molti dei microRNA che presentano una variazione di espressione nei tumori, sembrerebbero essere coinvolti nel controllo di vie di segnalazione intracellulare che hanno un'influenza diretta sulla crescita cancerosa, come ad esempio la proliferazione e l'apoptosi e potrebbero dunque funzionare da oncogeni o da oncosoppressori (Figura 8). È l'identificazione del loro bersaglio molecolare che ci permette di distinguerli: in generale vengono considerati miR oncosoppressori quei microRNA la cui riduzione di espressione rispetto ad una situazione fisiologica causa la conseguente sovraespressione dei livelli del loro bersaglio molecolare, un oncogene, direttamente implicato nell'induzione di processi correlati con la trasformazione tumorale (Figura 8b). Al contrario gli oncomiR, come si può osservare nella figura 8c, una volta attivati, inibiscono specificamente degli oncosoppressori, impedendo quindi la loro funzione di controllo delle normali attività cellulari, e causano l'acquisizione da parte della cellula di una o più caratteristiche neoplastiche.

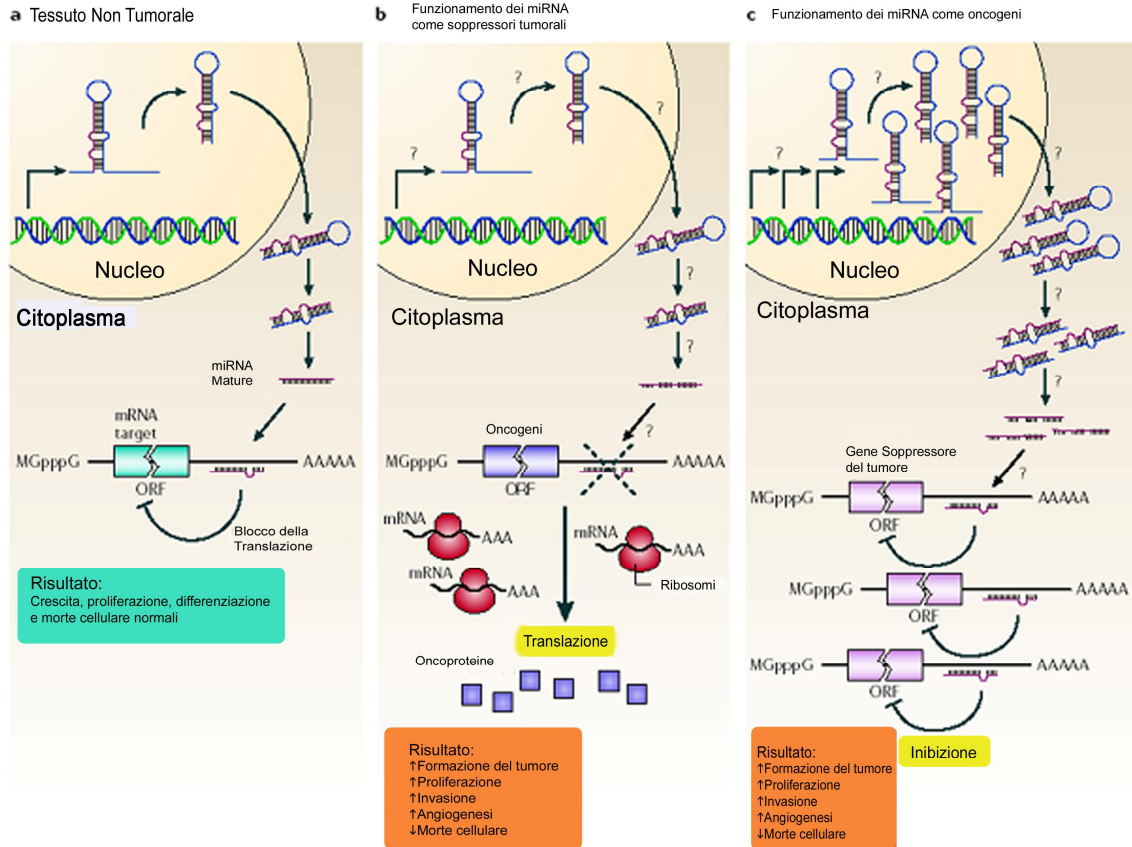


Figura 8. I microRNA possono funzionare sia da oncosoppressori che da oncogeni. **a)** Nel tessuto non tumorale un equilibrio fisiologico di espressione dei microRNA conduce ad un normale tasso di crescita cellulare, di proliferazione, differenziamento e morte cellulare. **b)** La riduzione o la delezione di un microRNA che funziona da oncosoppressore induce lo sviluppo del tumore tramite l'appropriate espressione della sua oncoproteina bersaglio. **c)** L'amplificazione del microRNA con ruolo oncogeno, elimina l'espressione del suo gene oncosoppressore target, permettendo alla cellula l'acquisizione di una serie di caratteristiche neoplastiche quali l'aumento del tasso di crescita, dell'invasività e la resistenza all'apoptosi. Modificato da Esquela-Kerscher and Slack, 2006

MicroRNA oncosoppressori

La prima evidenza che i microRNA potessero agire da oncosoppressori fu fornita dal gruppo di Calin che dimostrò che pazienti affetti da una comune forma di leucemia, la leucemia linfocitica cronica delle cellule B (CLL), presentano frequentemente delezioni o sottoespressione del cluster intronico di microRNA comprendente miR-15a e miR-16-1 (Calin *et al.*, 2002). Il locus dove mappano questi due microRNA, il 13q14, risulta essere

deleto in più del 65% dei casi di CLL come nel 16-40% dei mielomi multipli ed il 60% dei carcinomi prostatici. Più recentemente è stato dimostrato che il miR-15a e il miR-16-1 regolano in maniera negativa il gene anti apoptotico BCL2 la cui sovraespressione è stata riscontrata in molti tipi di cancro incluse le leucemie ed i linfomi (Cimmino *et al.*, 2005). Dunque la delezione o la diminuzione dell'espressione di miR-15 e 16 induce un aumento del suo bersaglio molecolare promuovendo lo sviluppo della leucemia e del linfoma. Inoltre in alcuni pazienti è stata riscontrata una mutazione ereditaria per sostituzione di una citosina in timidina 7 basi a valle del precursore del miR-16, che causa una riduzione dei livelli di espressione di questo microRNA, rafforzando ancor di più il ruolo di miR-16 come oncosoppressore (Calin *et al.*, 2005).

Anche i membri della famiglia dei microRNA Let-7, originariamente studiati per il loro coinvolgimento nel processo di sviluppo del nematode *C. elegans* (Reinhart *et al.*, 2000), mostrano un'attività oncosoppressiva in quanto regolano l'espressione del noto oncogene Ras. Le proteine Ras sono una famiglia di GTPasi di membrana che regolano la crescita cellulare e il differenziamento. Circa il 15-30% dei tumori umani presenta mutazioni di attivazione del gene Ras che inducono il processo di trasformazione maligna (Esquela-Kerscher and Slack, 2006). I microRNA codificati dalla famiglia let-7, che include 12 omologhi umani, sono considerati come oncosoppressori poiché mappano su siti fragili correlati con il cancro del polmone, della mammella, dell'utero e della cervice (Calin *et al.*, 2004). Un'ancor più diretta evidenza mostra che i trascritti di alcuni let-7 sono sottoespressi in maniera significativa nel carcinoma polmonare e questa riduzione correla con una cattiva prognosi (Takamizawa *et al.*, 2004). *In vitro*, la somministrazione di let-7 inibisce la proliferazione delle cellule di adenoma polmonare umano, tramite regolazione specifica di Ras, suggerendo per questo microRNA un ruolo essenziale nella regolazione negativa dello sviluppo di tale neoplasia (Johnson *et al.*, 2005). Tutti insieme, questi risultati, indicano che let-7 potrebbe rappresentare un promettente agente terapeutico nel trattamento del carcinoma

polmonare causato da mutazioni che attivino il gene Ras. Una ipotesi molto interessante è quella che la sottoespressione di let-7 possa rappresentare una caratteristica unica della progressione delle neoplasie polmonari. Infatti un'analisi ad ampio spettro su tessuti prelevati da differenti tipi tumorali, ha rivelato che la riduzione di let-7 è correlata prevalentemente con i campioni di cancro polmonare e solo in maniera sporadica con gli altri tipi di tumori. A supporto di questa ipotesi un'analisi per *microarray* ha mostrato anche che nessun altro microRNA sembra così fortemente modulato nel carcinoma del polmone (Johnson *et al.*, 2005).

Recenti evidenze hanno inoltre dimostrato una diretta correlazione fra la sottoespressione dei miR-143 e 145 ed il tumore del colon-retto (Michael *et al.*, 2003). Risulta essere di notevole interesse il fatto che i livelli dei precursori di questi due microRNA sembrano essere ugualmente abbondanti nel tessuto normale rispetto al tumorale, suggerendo che la differenza di espressione dei maturi sia dovuta ad una qualche alterazione dei meccanismi di processamento e non di trascrizione dei precursori.

MicroRNA oncogeni

Numerose sono le evidenze riguardo al funzionamento dei microRNA come oncogeni. Molte di queste sono associate all'alterazione di proteine ben note per il loro coinvolgimento nella promozione dello sviluppo tumorale come ad esempio l'oncogene MYC. Quest'ultimo codifica per un fattore di trascrizione spesso mutato e amplificato nei cancro umani, che è un importante regolatore della crescita cellulare (Pelengaris *et al.*, 2002).

Una prima importante evidenza è stata suggerita dalla scoperta che un tipo aggressivo di leucemia insorge quando MYC trasloca nel locus del miR-142. Questa traslocazione inserisce il gene MYC immediatamente a valle della sequenza codificante il pri-microRNA-

142 e sotto il controllo dello stesso promotore (Lagos-Quintana *et al.*, 2003). La perdita di una regione conservata di circa 20 nucleotidi che viene sostituita dalla traslocazione di MYC risulta nell'eliminazione del processamento del miR, provocando l'incremento di espressione di MYC e la trasformazione tumorale delle cellule di tipo B. Un altro noto microRNA, il miR-155, è associato alla sovraespressione di MYC ed al cancro di questo tipo cellulare. Questo microRNA è costituito da 21 nucleotidi che sono parte del più ampio RNA non codificante BIC (B-cell integration cluster), trovato sovraespresso nei linfomi delle cellule di tipo B overesprimenti MYC (Clurman and Hayward, 1989; Tam *et al.*, 1997). Il gruppo di Metzler ha mostrato un incremento di espressione di circa cento volte del miR-155 nel linfoma di Burkitt, ed altri studi hanno dimostrato lo stesso andamento nel linfoma di Hodgkin, nei mediastinali primari e nel linfoma diffuso a cellule B grandi (Eis *et al.*, 2005; Kluiver *et al.*, 2005; van der Berg *et al.*, 2003). Inoltre sembra che questo stesso microRNA possa funzionare da oncogene in cooperazione con MYC nella tumorigenesi, mentre in condizioni normali, durante la selezione delle cellule B, probabilmente inattiva geni che contrastano l'azione di MYC. Una overespressione di miR-155 è stata anche osservata nel carcinoma mammario, in quello polmonare, della tiroide e del colon (Eis *et al.*, 2005; He *et al.*, 2005; Volinia *et al.*, 2006). Il meccanismo mediante il quale BIC/miR-155 promuove lo sviluppo tumorale resta ancora sconosciuto. Sebbene sia stato dimostrato che il recettore di tipo I dell'angiotensina II sia un bersaglio molecolare del microRNA (Martin *et al.*, 2006), non sembra che questo possa essere il meccanismo regolatorio essenziale per l'attività oncogenica del miR-155, suggerendo che la ricerca di altri target molecolari sia importante nell'individuare il suo specifico ruolo nella trasformazione maligna.

Due lavori recentemente pubblicati hanno ulteriormente contribuito alla conferma della relazione fra miRNA, espressione di MYC e cancro (He *et al.*, 2005; O'Donnel *et al.*, 2005). Dall'analisi di linee cellulari e tessuti di pazienti affetti da linfoma delle cellule di tipo B è emerso che i microRNA maturi della famiglia 17-92, che comprende 7 microRNA i cui geni

risiedono nell'introne 3 del gene C13orf25, mostrano un sostanziale incremento di espressione rispetto a quella dei campioni di tessuti sani (He *et al.*, 2005). Allo stesso tempo è stato dimostrato che c-Myc induce l'espressione di sei di questi stessi microRNA sul cromosoma 13, conducendo allo sviluppo del linfoma umano (O'Donnel *et al.*, 2005). Inoltre in cellule HeLa, l'espressione del fattore di trascrizione E2F1 è regolata negativamente dal miR-17-5p e dal mir-20, il che suggerisce un nuovo meccanismo mediante il quale MYC contemporaneamente, attiva la trascrizione di E2F1 e allo stesso tempo ne limita la traduzione, grazie all'aumento di miR-17-5p e di miR-20, esercitando così un controllo molto fine sul segnale di proliferazione (O'Donnel *et al.*, 2005). Woods e collaboratori hanno proposto un modello in cui i microRNA del gruppo miR-17-92 promuovono la proliferazione cellulare spostando l'equilibrio trascrizionale di E2F dal ruolo antiapoptotico di E2F1 a quello proliferativo mediato da E2F3 (Woods *et al.*, 2007).

Anche per miR-21 è stato proposto e successivamente confermato dal punto di vista biologico funzionale, un ruolo da oncomirò. La prima evidenza è stata fornita dalla forte sovraespressione riscontrata prima nel glioblastoma multiforme (Chan *et al.*, 2005) e poi nei campioni di tessuti di carcinoma della mammella rispetto a quelli sani. L'inibizione del miR-21 mediante utilizzo di specifici oligonucleotidi antisenso in cellule di carcinoma mammario MCF-7 causa un aumento dell'apoptosi ed una riduzione della crescita cellulare; questo è in parte dovuto alla deregolazione dell'espressione di un target del miR-21, il fattore antiapoptotico Bcl-2 (Si *et al.*, 2007). Contemporaneamente un altro gruppo di ricerca ha dimostrato che nel medesimo ambiente cellulare, miR-21 agisce ulteriormente andando ad inibire direttamente l'espressione della tropomiosina 1, il cui ruolo fisiologico è quello di ridurre la proliferazione cellulare (Zhu *et al.*, 2007). L'aumento di espressione di miR-21 è stata associata a molti altri tipi di tumori ed allo stesso tempo sono stati identificati molti altri bersagli molecolari come ad esempio il noto oncosoppressore PTEN (Meng *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 2007). Sembra infatti che l'azione oncogena di questo microRNA sia ad ampio

raggio e possa esplicarsi mediante un meccanismo di regolazione pleiotropico inibendo l'espressione di differenti oncosoppressori bersaglio nello stesso tipo di tumore od in tumori differenti.

Ancor più recenti sono le evidenze riguardo il coinvolgimento dei microRNA e del loro ruolo oncogeno negli stadi avanzati della progressione tumorale. Fra queste, sono di notevole interesse quelle fornite dal gruppo di Weinberg che dimostrano il coinvolgimento del miR-10b nell'indurre il processo di metastatizzazione del tumore della mammella; infatti la sua overespressione in linee cellulari di carcinoma mammario non metastatizzanti causa un forte aumento del loro potenziale migratorio ed invasivo. Questo microRNA, la cui espressione è indotta direttamente dal fattore di trascrizione Twist, inibisce in maniera specifica la traduzione del mRNA di HOXD10, permettendo così l'espressione di geni coinvolti nella risposta pro metastatica (Ma *et al.*, 2007).

Tutte queste osservazioni confermano che i microRNA possano essere classificati come una famiglia di molecole direttamente attiva nella patologia del cancro, essendo, come abbiamo visto, coinvolti in prima linea in molti dei processi e delle vie molecolari che conducono allo sviluppo e progressione di un numero veramente ampio di tipi tumorali. In futuro la caratterizzazione di molti altri microRNA e l'identificazione dei loro bersagli molecolari associati, si rivelerà di notevole importanza non solo per la comprensione dei meccanismi molecolari che sono alla base della trasformazione maligna ma soprattutto per lo sviluppo di strategie cliniche atte ad inibire la crescita tumorale.

SCOPO DEL LAVORO

Negli ultimi anni un numero sempre più crescente di evidenze sperimentali ha correlato il cambiamento del profilo di espressione di microRNA singoli od in cluster con lo sviluppo di molti tipi di neoplasie (Metzler *et al.*, 2004; Michael *et al.*, 2003; Takamizawa *et al.*, 2004; Iorio *et al.*, 2005; He *et al.*, 2005; Murakami *et al.*, 2006; Chan *et al.*, 2005; Ciafrè *et al.*, 2005). Un recente studio condotto nel nostro laboratorio ha identificato, tramite analisi per *microarray* e *Northern blot*, che una coppia di microRNA, miR-221 e miR-222, codificati in tandem da un cluster di geni localizzati sul braccio corto del cromosoma X, mostra una sovraespressione nei campioni di tessuti e linee cellulari umani di glioblastoma multiforme, il più frequente e maligno dei tumori primari del cervello (Ciafrè *et al.*, 2005).

Successivamente è stato descritto lo stesso andamento di modulazione in molti altri tipi tumorali; infatti i livelli di espressione di miR-221 e miR-222, sia singoli che in coppia, sembrano subire un sensibile incremento anche nel tumore del colon, del pancreas, dello stomaco, nel carcinoma papillare della tiroide, in quello epatocellulare poco differenziato e nella leucemia linfoide acuta, in confronto con i rispettivi tessuti di controllo sani non tumorali (Volinia *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006; He *et al.*, 2005; Murakami *et al.*, 2006; Calin *et al.*, 2005).

Insomma questi dati suggerisce che questa coppia di microRNA possa essere considerata un marcatore tumorale e che possa giocare un ruolo funzionale fondamentale nella regolazione di alcuni processi cellulari che conducono all'attivazione di vie molecolari direttamente implicate nell'oncogenesi di diversi tipi tumorali.

Con questa idea come presupposto, lo stadio iniziale della mia ricerca è stato quello di andare ad analizzare quale fosse il profilo di espressione di questi due microRNA in modelli cellulari di cancro della prostata che rispecchiano differenti stadi della progressione di questa specifica neoplasia e sono associati ad un differente grado di tumorigenicità. Una volta

confermato che l'andamento di espressione di miR-221 e 222 in questi tipi cellulari sia analogo a quello riscontrato nelle altre specie tumorali, mi sono di conseguenza proposto di chiarire il ruolo funzionale associato a questi due specifici microRNA; vale a dire individuarne i bersagli molecolari, ed in base a questi, identificare le vie molecolari ed i processi cellulari che vengono alterati da miR-221 e miR-222 durante lo sviluppo del carcinoma prostatico.

Più in generale, lo scopo della mia tesi di dottorato è stato quindi di chiarire il possibile ruolo oncogenico di questi due microRNA nello sviluppo neoplastico del carcinoma prostatico. I risultati ottenuti potranno rivelarsi importanti non solo per aggiungere un tassello scientifico alla comprensione del puzzle eziologico che è all'origine del tumore della prostata, ma anche per gettare le basi teoriche dello sviluppo futuro di nuove strategie terapeutiche atte ad inibire la crescita di questo tipo di neoplasia, con il fine ultimo di bloccarne la progressione verso stadi più avanzati.

MATERIALI E METODI

METODI

Linee cellulari e tecniche di coltura

Tutti gli esperimenti sono stati condotti utilizzando linee cellulari umani aderenti in monostrato di carcinoma della prostata. Le cellule LNCaP con modalità di crescita dipendente dagli androgeni sono derivate da una metastasi linfonodale di un tumore umano poco aggressivo. Al contrario le PC3 derivano da una metastasi distale ossea di un tumore androgeno indipendente molto aggressivo. Questi sono due classici modelli cellulari che vengono diffusamente utilizzati per gli studi *in vitro* di sviluppo e progressione del carcinoma prostatico. La linea cellulare 22Rv1 è in grado di rispondere alla stimolazione degli androgeni ed è derivata da un tumore primario umano che è stato propagato in topo.

Tutte le linee cellulari sono state piastrate in terreno di crescita RPMI-1640 complementato con il 10% di FBS (siero fetale bovino) inattivato a 56° C, penicillina (100 u/ml) e streptomina (100 µg/ml). Le colture sono state mantenute in un incubatore a 37°C, 5% di CO₂, 85% di umidità e seminate durante gli esperimenti in capsule di petri ad una densità tale da poter permettere lo stato di subconfluenza durante tutto l'arco del trattamento.

Tecniche di preparazione e manipolazione del DNA

Le tecniche di preparazione e clonaggio del DNA e di batteriologia utilizzate nel corso del lavoro, sono state derivate da Sambrook *et al.*, 1989.

Sono qui di seguito elencate quelle più comunemente utilizzate:

- Reazioni di taglio endonucleolitico del DNA con enzimi di restrizione

- Elettroforesi su gel di agarosio
- Defosforilazione e fosforilazione di estremità 5' di frammenti di DNA
- Reazione di ligasi
- Trasformazione batterica
- Preparazione di cellule competenti (metodo CaCl₂)
- Preparazione di DNA plasmidico
- Purificazione di frammenti da gel di agarosio
- Sequenziamento di DNA eseguito da C.R.I.B.I. óBMR- Servizio sequenziamento DNA- presso l'Università degli studi di Padova

Costruzione dei plasmidi

Le sequenze di miR-221 , miR-222 e di entrambi in tandem, sono state amplificate tramite PCR da DNA genomico umano usando i seguenti oligonucleotidi come primers: miR-221 senso, 5'-cgagatctgtgagaattactgcaagctg-3' miR-221 antisenso, 5'-ccgctcgagcattggtgagacagccaatg-3' miR-222 senso, 5'-cgcagatcttttctccacagagcccctcc-3' miR-222 antisenso, 5'-ggggatcctctcaggacactgaagcaga-3' miR-222/221 senso, 5'-cgcagatcttttctccacagagcccctcc-3' miR-222/221 antisenso, 5'-gctcgaggcggctcttctctgactct-3'

Successivamente, la sequenze corrette dei prodotti di amplificazione sono state verificate per sequenziamento e clonate nel sito di restrizione *BamHI* del plasmide di espressione eucariotica pCDNA(+).3.1 per il miR-222 (p-222) e fra i siti *BamHI*- *XhoI* per il miR-221 (p-221) e miR-222/221 (p-T). L'espressione dei microRNA è stata valutata tramite analisi per Northern blot dopo 48 ore dalla trasfezione dei plasmidi in cellule LNCaP e 22Rv-1.

Saggio di attività della luciferasi

Il 3'UTR del gene umano di p27 è stato amplificato tramite PCR, utilizzando come *primers* i seguenti oligonucleotidi: 5'-cagctcgaattaagaatatg-3' e 5'-gtgtaacaataattggcatc-3' e clonato a valle del codone di terminazione del gene di *renilla luciferase* nel vettore pRLTK (Rl-luc, Promega). Questo costrutto reporter (p3'UTR-p27) è stato utilizzato per ideare, tramite PCR inversa, il plasmide contenente la regione mutata del 3'UTR di p27 (p3'UTRmut-p27) con i seguenti primers: Rev-mut1269 5'-aaccaccaacgcttttagaggcagatc-3', Forw-1270 5'-cattatgcaattaggtttcc-3', Rev-1331 5'-ggtaaaactatatacacagg-3', Forw-mut1336 5'-ggaggttcacataaactttggggaagg-3'.

Le linee di coltura LNCaP, stabilmente esprimenti p-221, p-222 o p-T, sono state trasfettate con i plasmidi p3'UTR-p27 o p3'UTRmut-p27 più il vettore di controllo pGL3 (Pp-luc, Promega), e dopo 48 ore raccolte. L'analisi dell'attività luciferasica è stata testata con l'utilizzo del Dual Luciferase Assay (Promega) in accordo con le specifiche della casa produttrice. L'esperimento è stato condotto in triplicato per un numero di tre volte.

Trasfezioni

Tutte le trasfezioni sono state condotte in piastre da 60 mm ad una confluenza cellulare del 80-90%, tramite utilizzo di 12 µl di reagente Lipofectamine 2000 (Invitrogen) e 8 µg di DNA plasmidico in terreno Opti-mem (Invitrogen) seguendo le istruzioni della casa produttrice.

Per le trasfezioni transienti, 7 µg di plasmide pCDNA(+)-3.1 contenente il miR-221 e/o il miR-222 è stato cotrasfettato con un costrutto reporter, pEGFP-C3 (Clontech), per permettere il monitoraggio dell'efficienza di trasfezione valutata mediante microscopio a

fluorescenza alle 48 ore dall'inizio della trasfezione. Per ogni singolo pozzetto, è stato contato il numero di cellule presenti in quattro campi visivi presi in maniera casuale e l'efficienza di trasfezione è stata stimata come valore medio di cellule esprimenti la proteina fluorescente verde (GFP) su un totale di 100 cellule per campo visivo.

Nelle trasfezioni stabili, le cellule LNCaP sono state selezionate con l'aggiunta nel terreno di crescita di 0,4 mg/ml di G418 dopo 48 ore dalla trasfezione. Una volta ottenute colture stabili, la concentrazione dell'antibiotico è stata ridotta fino ad una dose di mantenimento di 0,2 mg/ml.

Silenziamento di p27 e *knockdown* dei microRNA

Negli esperimenti di silenziamento dei livelli di espressione di p27, le cellule LNCaP sono state trasfettate per mezzo del reagente Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 24 ore dopo il piastramento, ad una concentrazione finale di 100nM di SMART pool siRNA anti p27 (Dharmacon). Le cellule sono state successivamente raccolte dopo 24-48 ore per l'analisi di espressione proteica.

Nelle cellule PC3, gli oligonucleotidi (FITC-labeled LNA, Exiqon) disegnati contro le sequenze di miR-221 e miR-222, sono stati trasfettati (Lipofectamine 2000) ad una concentrazione di 40nM ciascuno. A 24 e 48 ore dalla trasfezione, le cellule sono state raccolte ed utilizzate per le analisi di Northern e Western blot.

Crescita e sopravvivenza cellulare

La crescita cellulare è stata valutata con il saggio MTS (CellTiter 96 A_{queous} assay with MTS tetrazolium, Promega), che rappresenta un metodo colorimetrico per determinare il numero di cellule vitali in coltura. Il 3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)-5-(carbossimetossifenil)-2-(4-

solfoni)-2H-tetrazolo o appunto MTS, viene ridotto dalle cellule metabolicamente attive in un prodotto colorato solubile nei terreni di coltura che viene rilevato ad una lunghezza d'onda di 490 nm. Le cellule sono state piastrate ad una densità di $2,5 \times 10^4$ per pozzetto in una piastra da 96 microwelles ed incubate per 24 ore per permettere la completa adesione cellulare prima di essere trasfettate con SMART pool siRNA negli esperimenti riguardanti il silenziamento genico. La crescita cellulare è stata misurata dopo due e quattro giorni, considerati a partire dal momento in cui è stata valutata la corretta adesione cellulare (24 ore circa). Seguendo le istruzioni della casa produttrice, 20 μ l di soluzione MTS sono stati aggiunti a 100 μ l di terreno di coltura e dopo un'ora di incubazione è stata misurata la densità ottica a 490 nm.

Saggio di crescita indipendente dall'ancoraggio (*Soft Agar Assay*)

Per testare il potenziale clonogenico delle linee cellulari è stato condotto il saggio di crescita su Soft Agar. Una caratteristica essenziale della trasformazione cellulare è rappresentata dalla capacità di crescere in maniera indipendente dall'adesione all'interno di un mezzo semisolido quale agar poco concentrato. Questo tipo di crescita in sospensione, conduce alla formazione di colonie, la cui grandezza, rappresenta in vitro un test efficace di valutazione della tumorigenicità cellulare.

$2,5 \times 10^3$ cellule LNCaP stabilmente esprimenti i microRNA miR-221 o miR-222 oppure cellule PC3 sono state sospese in un terreno contenente agar al 0,35% e piastrate in capsule di Petri da 35 mm sopra uno strato basale di terreno ed agar al 0,5% precedentemente preparato. Negli esperimenti riguardanti il silenziamento di p27 o l'utilizzo degli oligonucleotidi LNA contro miR-221 e miR-222, le cellule sono state piastrate a 24 ore dall'inizio della trasfezione. Dopo essere state mantenute in un incubatore cellulare per

almeno 2 settimane, le piastre sono state colorate con una soluzione di crystal violet 0,005% che permette alle colonie di essere maggiormente visibili.

Le colonie ottenute sono state dapprima fotografate al microscopio ottico ad un ingrandimento 10x e poi, tra esse, sono state contate solo quelle con un diametro superiore a 0,1 mm per le LNCaP e 0,15 mm per le PC3. Ogni esperimento è stato condotto in triplicato per due volte.

Marcatura con bromodeossiridina e lettura al FACS

5×10^6 cellule LNCaP trasfettate sono state seminate in piastre da 60-mm ed incubate a 37°C per 48 ore. Dopo aver effettuato il trattamento con 10 μ M di 5-bromodeossiridina (BrdU, Sigma Chemical Co.) per un tempo di 30 minuti, le cellule sono state staccate con tripsina, lavate ed incubate mezz'ora con HCl 2M per permettere la completa denaturazione del DNA in molecole a filamento singolo. Successivamente ad un lavaggio in una soluzione 0,1 M di sodio tetraborato a pH 8,5, le cellule sono state incubate per un'ora con 0,65 μ g/ml di anticorpo anti-BrdU (Necton Dickinson) a temperatura ambiente, risospese in 200 μ l di una soluzione di PBS e finalmente marcate con 5 μ l di un anticorpo FITC coniugato (Calbiochem) per trenta minuti al buio. Dopodichè, è stato effettuato un lavaggio ed il pellet cellulare, è stato risospeso in una soluzione di PBS contenente 10 μ g/ml di ioduro di propidio (PI) per 25 minuti. L'analisi dei campioni è stata condotta dal Dottor Ezio Giorda presso il Centro di Ricerca dell'ospedale "Bambino Gesù" con il citofluorimetro FACSCalibur (Becton Dickinson) avvalendosi del software "Cell quest". Per gli esperimenti in cui sono stati utilizzati gli siRNA anti p27, le cellule sono state raccolte a 72 ore dalla trasfezione e trattate come descritto precedentemente. Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti tre volte.

Estrazione del RNA e analisi per Northern blot

L'RNA totale è stato estratto sia dalle linee cellulari LNCaP, PC3 e 22Rv-1, che dai tumori generati dalla crescita sottocutanea in topi scid di cellule LNCaP, con il reagente Trizol (Invitrogen) seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Il pellet di RNA ottenuto, è stato risospeso in 20-40 µl di acqua DEPC priva di endonucleasi, quantificato mediante lettura allo spettrofotometro e la sua integrità è stata valutata tramite corsa elettroforetica in un gel di agarosio 0,8%.

Nell'analisi dei microRNA per Northern Blot, 15-20 µg di RNA totale sono stati denaturati per 5 minuti a 65°C prima di essere caricati su un gel denaturante di Poliacrilammide al 10%. Al termine della migrazione elettroforetica (due ore a 20-25 mA in TBE 1X) l'RNA è stato trasferito dal gel alla membrana di nylon (Immobilon-Ny+, Millipore corporation) tramite elettroblotting a 35 volts per circa 2 ore e successivamente fissato con esposizione a raggi UV. Per rilevare l'espressione dei microRNA sono state utilizzate sonde di circa 20 nt con sequenza complementare alla molecola di RNA che si vuole analizzare. Questi specifici oligonucleotidi, le cui sequenze sono: anti miR-221, 5'-gaaaccagcagacaatgtagc-3' e anti miR-222, 5'-gagaccagtagccagat-3' sono stati marcati radioattivamente per 40 minuti a 37°C mediante T4-polinucleotide-chinasi (New England Biolabs), che trasferisce il fosforo radioattivo (³²P) dal ATP alla loro estremità 5' terminale.

La sonda è stata denaturata per 5 minuti a 95°C prima di essere aggiunta ad una miscela di pre-ibridazione (vedi paragrafo materiali) in cui è stata precedentemente immersa la membrana di nylon per due ore a 37°C. Il tutto è stato poi lasciato ibridare a 37°C per circa 16 ore (overnight). Il giorno dopo la membrana è stata sottoposta a lavaggi in SSPE a stringenza (temperatura e forza ionica) sempre più crescente per rimuovere la sonda legata in maniera aspecifica all'RNA. Effettuati i lavaggi e ottenuta una giusta intensità del segnale

radioattivo (rilevato con un contatore Geiger) è stata esposta per tempi più o meno brevi (circa 24-72 ore ad una lastra autoradiografica e poi sviluppata).

Lo stesso filtro è stato poi re-ibridato con una sonda oligonucleotidica complementare al piccolo RNA nucleare snRNA U6 (5'-caccgaatttcggtgcatccttgccgagggcc-3') per la normalizzazione della quantità di RNA caricata sul gel.

Le bande impressionate sulla lastra, sono state quantificate per mezzo del software Image J.34s.

Estrazione delle proteine e Western Blot

Le cellule per l'estrazione delle proteine sono state seminate in capsule di Petri da 35 e/o 60 mm ad una densità tale che al momento della raccolta (48h e/o 72h) la confluenza raggiunta non risultasse più elevata del 80-90%.

Le cellule sono state lavate due volte in PBS e centrifugate a 4°C a 1200rpm. Il pellet ottenuto è stato risospeso in 100µl di una soluzione di lisi cellulare (*Lysis Buffer*) per 20 minuti in ghiaccio. Dopo centrifugazione a 12000g, il sovrinatante contenente l'estratto proteico è stato prelevato e quantificato tramite lettura allo spettrofotometro (assorbanza alla lunghezza d'onda di 595 nm) rispetto ad una curva standard per la BSA (Albumina di Siero Bovino) a concentrazione nota con l'utilizzo del reagente BRADFORD (BRADFORD Reagent SIGMA).

30µg dell'estratto totale proteico sono stati denaturati a 95°C e successivamente separati su un gel SDS-PAGE al 12% prima di essere trasferiti su una membrana di nitrocellulosa. Per il controllo qualitativo e quantitativo del trasferimento la membrana è stata immersa per qualche minuto in una soluzione 5mg/ml di Rosso Ponceau e acido acetico 1%.

Dopo aver saturato per due ore con una soluzione di PBS e Tween 0,5µl/ml e latte (skim milk, Biorad) al 5%, la membrana è stata incubata per tutta la notte con l'anticorpo primario

policlonale anti-p27 (AB3003, Chemicon) ad una diluizione 1:1000. Il giorno seguente, dopo tre lavaggi di circa 20 minuti con la soluzione PBS e Tween 0,5µl/ml ed una incubazione di un'ora con un anticorpo secondario coniugato all'enzima HRP (*Perossidasi di Rafano*) (AP 132P, Chemicon), i livelli di espressione della proteina p27 sono stati rilevati tramite utilizzo del kit *ECL Plus Western Blotting detection reagents* (Amersham Biosciences) e successiva esposizione ad una lastra autoradiografica.

Per il controllo di isocarcamento dei campioni è stato utilizzato l'anticorpo anti actina (A2066, Sigma), mentre la quantificazione delle bande è stata condotta tramite ImageJ 1.34 s o OptiQuant 3.1 Packard Instrument software.

Xenotrapianto di cellule LNCaP

Le cellule utilizzate per gli inoculi sottocutanei sono state lavate due volte in PBS e risospese in una soluzione 50%PBS e 50%Matrigel (Becton Dickinson) ad una concentrazione finale di $3 \times 10^6 / 200 \mu\text{l}$. Topi B17-SCID di 5 settimane hanno ricevuto sul fianco destro 3×10^6 cellule LNCaP stabilmente esprimenti il microRNA 221 (p-221) e sul fianco sinistro lo stesso numero di cellule trasfettate con il vettore vuoto pCDNA3.1(+). Lo sviluppo dei tumori sotto cute è stato monitorato regolarmente ed il volume di ciascuno è stato misurato almeno una volta a settimana con il calibro e calcolato con la seguente formula: Volume = diametro maggiore x (diametro minore)² x 0,5. I topi sono stati sacrificati quando la massa tumorale era divenuta tale da impedire i movimenti degli animali ed i tumori sono stati prelevati chirurgicamente e conservati in RNA Later (Ambion) per la successiva analisi molecolare.

Dopo essere stati lavati in PBS, 60-100 mm³ di tessuto tumorale sono stati divisi in due parti, una delle quali è stata omogeneizzata in Trizol (Invitrogen) per l'estrazione del RNA effettuata come descritto nella sezione estrazione del RNA e analisi per Northern blot;

l'altra invece è stata utilizzata per l'analisi proteica, omogenizzando il tutto con 200 µl di soluzione di lisi cellulare.

MATERIALI

Ceppi batterici

XL 1-blue	supE44 hsdR17 recA1 end A1 gyrA46 thi relA1 lac-F ϕ (probAB+lacIq lacZ DM15 Tn 10 tetr)
DH 5	supE44 lacU 169 (80 lacZ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 rel A1
HB 101	supE44 hsdS20 (r _B m _B) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1

Terreni di coltura per batteri

Brodo (LB)

NaCl 5 g/litro

Peptone 10 g/litro

Estratto di lievito 5 g/litro

Tris-HCl (pH 7.5) 10 mM

Agar

LB + 12,5 g/litro di Agar

Soluzioni per colture cellulari

PBS

NaCl 100 mM

KCl 2,7 mM

Na₂HPO₄ 8 mM

KH₂PO₄ 1,4 mM

Terreno di coltura cellulare per linee di PCa

RPMI-1640

Siero fetale bovino 5%

L-glutammina 2mM

Penicillina 100 U/ml

Streptomicina 0,1 mg/ml

Terreni di coltura per il saggio di crescita indipendente dall'ancoraggio

Strato basale

Strato alto

RPMI-1640 2x 50%

50%

Siero fetale bovino 10%

10%

Agar 0,5%

0,35%

Soluzioni per l'elettroforesi

TBE (5x)

Tris-HCl (pH 7.5) 450 mM

Acido Borico 450 mM

EDTA 10 mM

Soluzioni per analisi Northern blot

Gel di poliacrilammide/TB UREA

TB UREA Acrilammide 20%	50%
TB UREA 20%	50%
APS 10%	0,5 µl/ml
TEMED	0,05 µl/ml

Miscela di preibridazione

DENHARDT	1x
SSPE	6x
Salmon sperm DNA	
SDS	0,5%

Composizione del Lysis Buffer

Tris HCl pH 7,6	50 mM
NP40	1%
SDS	0,1%
NaCl	150 mM
EDTA	5 mM
NaF	100 mM
NaPPi	2 mM
Na ₃ VO ₄	2 mM
PMSF	1 mM
Leupeptina	10 µg/ml
Aprotinina	10 µg/ml
Pepstatina	10 µg/ml

RISULTATI

I microRNA miR-221 e miR-222 sono espressi solamente nella linea cellulare PC3, mentre risultano assenti in cellule LNCaP e 22Rv1. La loro espressione risulta essere inversamente correlata a quella della proteina p27.

L'obiettivo iniziale del lavoro è stato quello di analizzare il profilo di espressione dei microRNA 221 e 222 in modelli di linee cellulari umane di carcinoma della prostata. Per questo scopo, sono state utilizzate tre linee cellulari, PC3, LNCaP e 22Rv1 che virtualmente rappresentano stadi differenti della progressione di questo tipo di neoplasia. Come si può notare nella figura 1, questo studio condotto tramite analisi per Northern blot su RNA totale, ha rivelato che entrambi i microRNA mostrano un'espressione differenziale nelle linee cellulari saggiate. Infatti miR-221 e miR-222 sembrano essere fortemente espressi nelle cellule PC3, la cui crescita è indipendente dagli androgeni, e che derivano da una metastasi distale ossea di un tumore molto aggressivo, mentre al contrario i due microRNA appaiono assenti o scarsamente espressi nella linea LNCaP androgeno dipendente e molto meno tumorigenica, derivata da una metastasi locale linfo-nodale. Un livello di espressione simile a quello riscontrato nelle LNCaP è stato osservato anche nella linea cellulare androgeno responsiva 22Rv1 originata da un tumore primario.

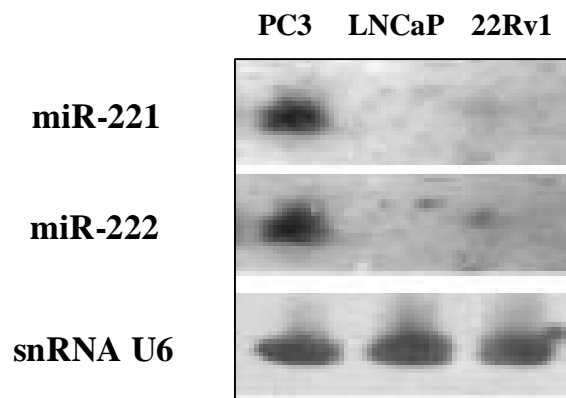


Figura 1. Analisi di espressione per Northern blot dei miR-221 e 2222 in linee cellulari di carcinoma di prostata

L'analisi di predizione bioinformatica, condotta alla ricerca dei bersagli molecolari di entrambi i microRNA è stata effettuata tramite l'utilizzo di due programmi accessibili in rete, Pictar e Targetscan, ed ha rivelato, almeno inizialmente, circa duecento mRNA che possono ipoteticamente essere riconosciuti da entrambi i microRNA. Fra questi, alla ricerca di quelli che potessero presentare delle caratteristiche correlate con i processi coinvolti nella progressione del carcinoma prostatico, si è mostrato di notevole interesse il gene CDKN1B, codificante per p27^{Kip1}. Infatti la sua 3' UTR presenta almeno due siti che possono essere riconosciuti sia dal miR-221 che dal miR-222, essendo le due "seed sequence" di questi microRNA identiche, e dunque capaci teoricamente di interagire con gli stessi siti (Figura 2).

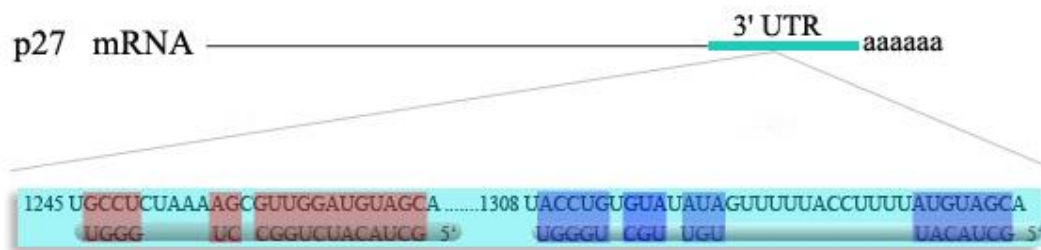


Figura 2. Ipotetici siti di appaiamento (nucleotidi 1262-1269 e 1336-1342) per i microRNA 221 e 222 sul 3' UTR del mRNA di p27 predetti dall'analisi bioinformatica condotta mediante utilizzo dei programmi di predizione Pictar e Targetscan.

Per supportare l'ipotesi che il noto gene oncosoppressore p27, il cui ruolo nella carcinogenesi della prostata è stato ampiamente descritto nella parte introduttiva di questo lavoro, possa essere uno dei possibili bersagli molecolari di questa coppia di microRNA, è stata condotta un'analisi per Western Blot sui livelli di espressione fisiologici di questa stessa proteina nelle tre linee cellulari. Come è osservabile nella figura 3, p27 risulta essere abbondantemente espressa in cellule LNCaP e 22Rv1, mentre è fortemente ridotta in cellule PC3; i livelli di p27 sono dunque correlati inversamente a quelli dei miR-221 e 222 nei

modelli di linee cellulari di cancro della prostata qui analizzati. Questa evidenza sperimentale, unita a quella bioinformatica ha fornito una prima indicazione sulla possibile interazione fra miR-221 e 222 e p27 nell'ipotesi che l'espressione dei due microRNA potrebbe rappresentare un meccanismo essenziale nella regolazione negativa di p27 nelle cellule di carcinoma della prostata.

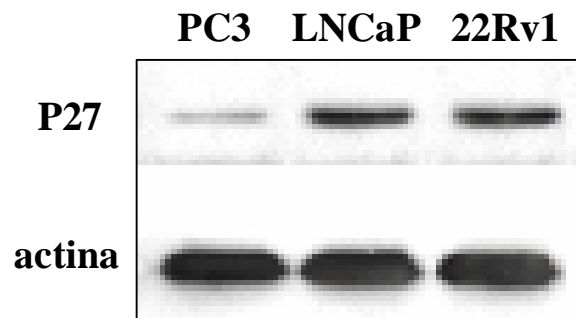


Figura 3. Analisi per Western Blot dei livelli proteici di p27 in linee cellulari di carcinoma prostatico. I livelli proteici di actina sono mostrati come controllo di isocaricamento.

La sovraespressione di miR-221, miR-222 o entrambi, riduce i livelli di p27 nelle cellule LNCaP e 22Rv1, mentre la loro sottoregolazione incrementa l'espressione di p27 nelle cellule PC3

Per studiare se l'espressione di miR-221 e miR-222 possa effettivamente influenzare i livelli di espressione di p27 nell'ambiente cellulare dei modelli di carcinoma della prostata qui utilizzati, l'espressione dei suddetti microRNA, singolarmente o insieme, è stata modulata ectopicamente e le conseguenze di questa alterazione sulla espressione della proteina p27 sono state analizzate a livello quantitativo.

La strategia iniziale adottata è stata quella di overesprimere miR-221 e miR-222 in cellule LNCaP e 22Rv1, che come è stato detto in precedenza mostrano scarsi livelli di espressione di entrambi questi microRNA. A questo scopo abbiamo le sequenze genomiche del miR-221, del miR-222 o l'intera regione comprendenti entrambi i microRNA codificati in tandem sono stati clonati nel plasmide di espressione eucariotica pCDNA3.1, ottenendo tre costrutti differenti, P-221, p-222 e p-T (tandem) che sono stati utilizzati per trasfettare le due linee cellulari. L'effettiva sovraespressione dei microRNA in cellule LNCaP indotta dalla trasfezione con i plasmidi è stata verificata tramite analisi per Northern blot su estratto totale di RNA; infatti come è mostrato nella figura 4a, le cellule LNCaP trasdotte con p-221, p-222 e p-T esprimono livelli abbondanti dei microRNA attesi se confrontate con le stesse cellule trasfettate con il plasmide di controllo pcDNA3 (c). Un simile risultato è stato ottenuto con la trasfezione del p-221 in cellule 22Rv1 (Figura 4b).

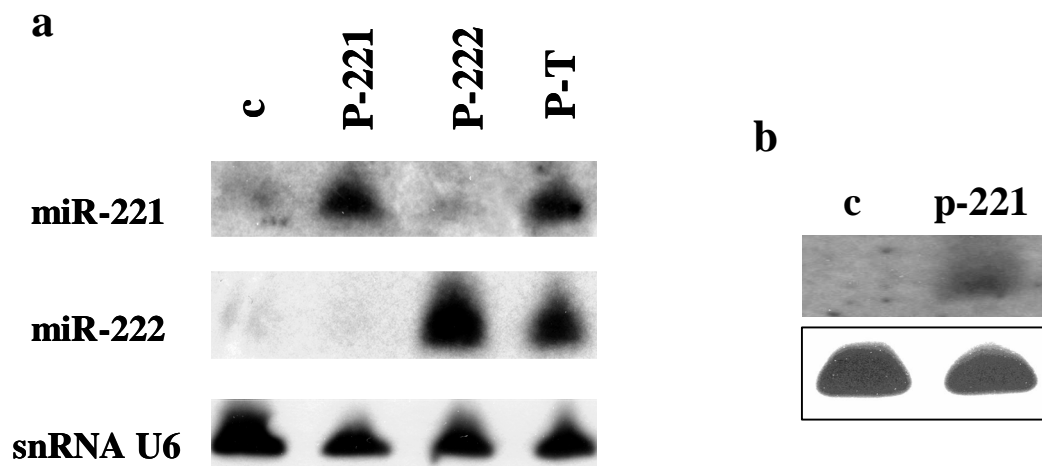


Figura 4. Analisi per Northern blot di RNA totale estratto da cellule a) LNCaP e b) 22Rv1 trasfettate con i plasmidi p-221, p-222 e p-T.

L'effetto della sovraespressione ectopica di miR-221, di miR-222 o di entrambi sui livelli di p27 è stato saggiato mediante analisi per Western blot. Come rappresentato in figura 5 sia le

cellule LNCaP che le 22Rv1 esprimenti uno o entrambi i microRNA, mostrano una riduzione dei livelli di espressione della proteina p27 di circa il 50% rispetto a quelli riscontrati nelle cellule di controllo trasfettate con il vettore vuoto (Figura 5a e 5b), rafforzando ancor di più l'ipotesi che i microRNA 221 e 222 siano in grado di regolare i livelli di espressione di p27 nell'ambiente cellulare del carcinoma prostatico.

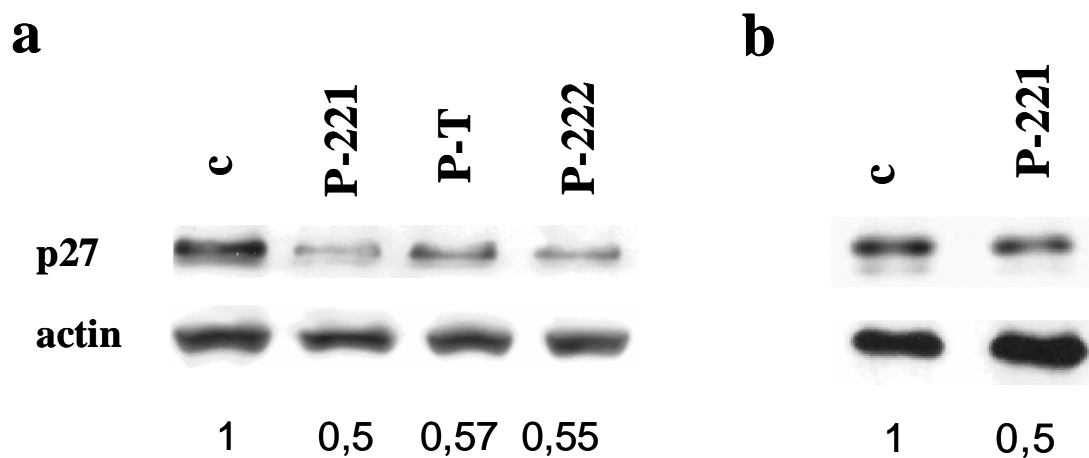


Figura 5. Analisi per Western blot dell'espressione di p27 su estratti proteici delle cellule a) LNCaP trasfettate con p-221, p-T e p-222 e b) 22Rv1 con p-221.

Per fornire un'ulteriore evidenza riguardo all'interazione fra p27 ed i due microRNA, nella linea cellulare PC3 che li esprime entrambi in maniera endogena (Figura 1), ne è stata inibita l'espressione mediante utilizzo di oligonucleotidi antisense stabilizzati (LNA, *locked nucleic acid*) disegnati in modo da appaiarsi specificamente alle sequenze nucleotidiche di miR-221 e 222, sopprimendo così la loro espressione. Come si può osservare nel pannello superiore della figura 6, le cellule PC3 trasfettate con gli LNA oligonucleotidi anti-221 e anti-222 presentano una riduzione dei livelli di miR-221 e miR-222 di circa due volte rispetto a quelli delle cellule *wild type* (-) non trasdotte o di quelle trasfettate con un LNA oligonucleotide di sequenza complementare ad un microRNA non espresso nelle cellule di

mammifero utilizzato come controllo (LNA-c). In questo modello sperimentale, complementare a quello delle cellule LNCaP e 22Rv1, l'analisi per Western blot (figura 6, pannello inferiore) ha evidenziato che l'inibizione di espressione dei due microRNA ottenuta, viene accompagnata da un sensibile aumento dei livelli di proteina p27, la cui espressione risulta essere circa il doppio se confrontata con quella misurata nelle cellule di controllo.

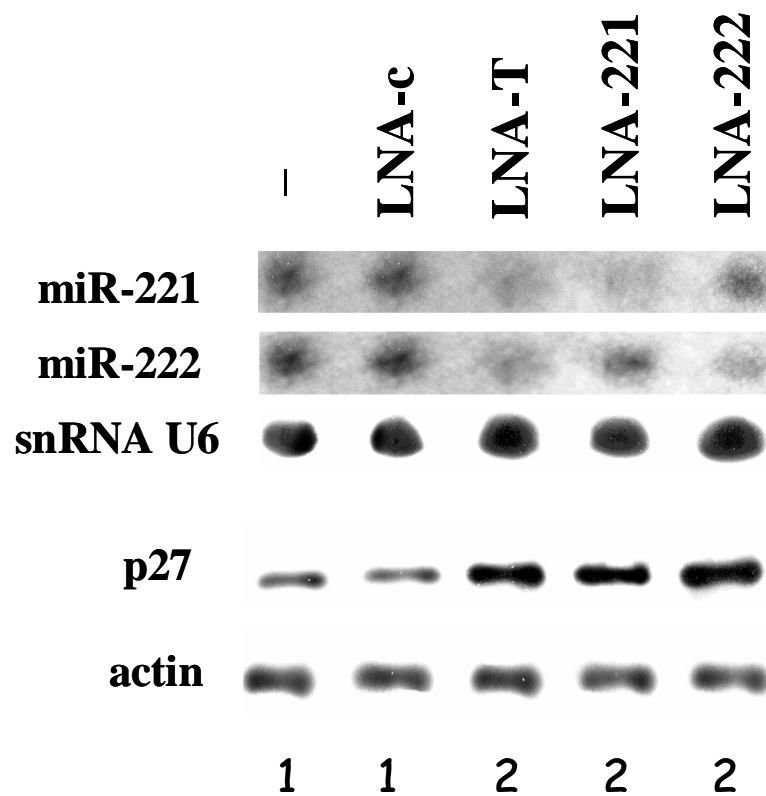


Figura 6. Analisi per l'espressione di miR-221 e miR-222 (Northern Blot, pannello superiore) e p27 (Western Blot, pannello inferiore) in PC3 trasfettate con LNA oligonucleotide anti miR-221 (LNA-221), anti miR-222 (LNA-222) e questi due insieme (LNA-T). Le trasfezioni di controllo sono state effettuate utilizzando un oligonucleotide LNA-c la cui sequenza non è complementare con nessun microRNA di mammifero. I numeri presenti sotto a ciascuna corsia indicano una quantificazione relativa dell'espressione di p27, per la quale l'espressione delle cellule non trasfettate è stata arbitrariamente indicata pari ad uno.

Questi risultati ottenuti tramite modulazione di espressione dei miR-221 e 222, convergono verso l'identificazione dell'RNA messaggero di p27 come bersaglio molecolare della coppia di microRNA, nelle linee cellulari di carcinoma di prostata analizzate.

I microRNA-221 e 222 interagiscono in maniera diretta con il 3'UTR del RNA messaggero di p27

Per dimostrare che nell'ambiente cellulare di carcinoma di prostata, la regolazione dei livelli di espressione di p27 ottenuta tramite modulazione di espressione di miR-221 e 222, sia una conseguenza diretta dell'interazione di quest'ultimi con i siti di appaiamento sul 3'UTR del RNA messaggero di p27 predetti nell'analisi bioinformatica, è stato condotto un saggio di luciferasi. Per questo scopo, l'intera 3' UTR di p27 è stata clonata a valle della regione codificante il gene della luciferasi e questo costrutto *reporter* è stato impiegato per trasfettare cellule LNCaP precedentemente trasdotte con i plasmidi p-221, p-222 o p-T. Le barre in verde dell'istogramma della figura 7 mostrano che la presenza del miR-221, miR-222 o di entrambi in tandem, verificata per Northern Blot (vedi figura 4), induce una sensibile riduzione (circa più del 50%) dell'espressione della luciferasi, misurata come attività luciferasica relativa. Questo risultato è perfettamente comparabile in tutte e tre le linee che sono state trasfettate sia che esprimano uno solo dei due microRNA, sia che li esprimano contemporaneamente entrambi.

Al contrario, quando come costrutto *reporter* è stato utilizzato un plasmide contenente il 3' UTR del RNA messaggero di p27 in cui i due siti specifici di appaiamento per il miR-221 e il miR-222 erano stati inattivati mediante mutagenesi sito-specifica, si è osservato, come si può notare dalle barre gialle del grafico della figura 7, solamente un debole effetto di

decremento non statisticamente significativo dell'attività luciferasica prodotto dalla presenza dei microRNA rispetto alle cellule di controllo (C) in cui l'espressione di quest'ultimi non è stata indotta.

Questi risultati confermano in maniera definitiva la veridicità dell'analisi bioinformatica precedentemente condotta, indicando che i due siti predetti di appaiamento sul 3'UTR di p27 predetti, vengono effettivamente riconosciuti da miR-221 e miR-222 che, mediante interazione fisica diretta, contribuiscono fortemente nella regolazione post-trascrizionale del gene p27 identificandolo come loro bersaglio molecolare.

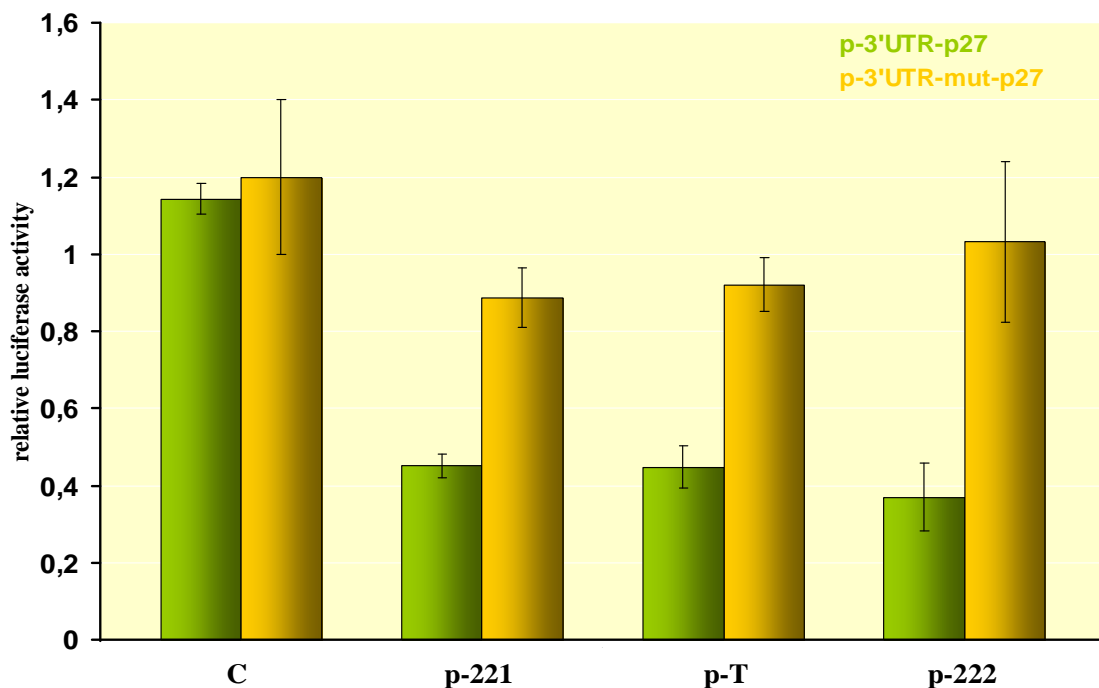


Figura 7. Risultato del saggio di luciferasi per la dimostrazione dell'interazione specifica di miR-221 e 222 con i siti di appaiamento sul 3' UTR del mRNA di p27 predetti dall'analisi bioinformatica. Le barre verdi rappresentano l'attività luciferasica relativa misurata in cellule LNCaP trasfettate con il costrutto reporter in cui è stata clonata l'intera regione 3'UTR di p27. Le barre gialle, al contrario, si riferiscono alle cellule trasfettate con un costrutto reporter, utilizzato come controllo che presenta la regione 3'UTR con i due siti di appaiamento per i microRNA, inattivati da mutagenesi sito specifica. Le sigle C, p-221, p-T e p-222, rappresentano rispettivamente cellule LNCaP di controllo o esperimenti miR-221, miR-221 e 222 insieme, o miR-222.

L'espressione ectopica di miR-221 e miR-222 aumenta la crescita delle cellule LNCaP e ne induce la progressione in fase S del ciclo cellulare

Un passo successivo per la comprensione del ruolo di miR-221 e miR-222 nei modelli cellulari di carcinoma prostatico è stato quello di analizzare le conseguenze funzionali della dimostrata variazione di p27 dovute alla modulazione di espressione di miR-221 e miR-222. Prendendo in considerazione il ruolo di p27 come regolatore negativo del ciclo cellulare e più specificamente della transizione dalla fase G1 a quella S, la prima caratteristica cellulare analizzata è stata la capacità proliferativa di cellule LNCaP stabilmente trasfettate con i plasmidi p-221, p-222 e p-T.

La figura 8 mostra i risultati di un saggio MTS in cui la crescita di cellule trasfettate con il plasmide vuoto di controllo (p-C) è confrontata con quella delle cellule che esprimono i microRNA: l'espressione di quest'ultimi, sia singolarmente che in tandem, induce, come è documentato dal differente andamento delle curve rappresentate, un marcato incremento del tasso di crescita, che, alle 96 ore dall'inizio dell'esperimento, è addirittura più che duplicato rispetto a quello delle cellule LNCaP di controllo (figura 8a). Un andamento molto simile è stato riscontrato in un esperimento analogo in cui la riduzione dei livelli di p27 nella stessa linea cellulare è stata indotta mediante la trasfezione di un RNA interferente specifico contro p27 (siRNA anti-p27). Come è osservabile nella figura 8b, il siRNA anti-p27, che è in grado di indurre un abbassamento di circa il 60% della proteina p27 (dato non mostrato), determina un aumento della capacità proliferativa delle LNCaP molto simile a quella causata dalla presenza di miR-221 e/o miR-222.

Per correlare l'aumento del tasso proliferativo mediato dall'azione di questi due microRNA su p27 con il ruolo specifico di questo noto oncosoppressore nella regolazione della transizione G1-S del ciclo cellulare, sono stati messi a punto esperimenti in cui gli eventuali cambiamenti indotti dalla overespressione di miR-221 e 222 sulla distribuzione delle fasi del

ciclo cellulare delle LNCaP sono stati misurati mediante analisi di citometria di flusso (FACS).

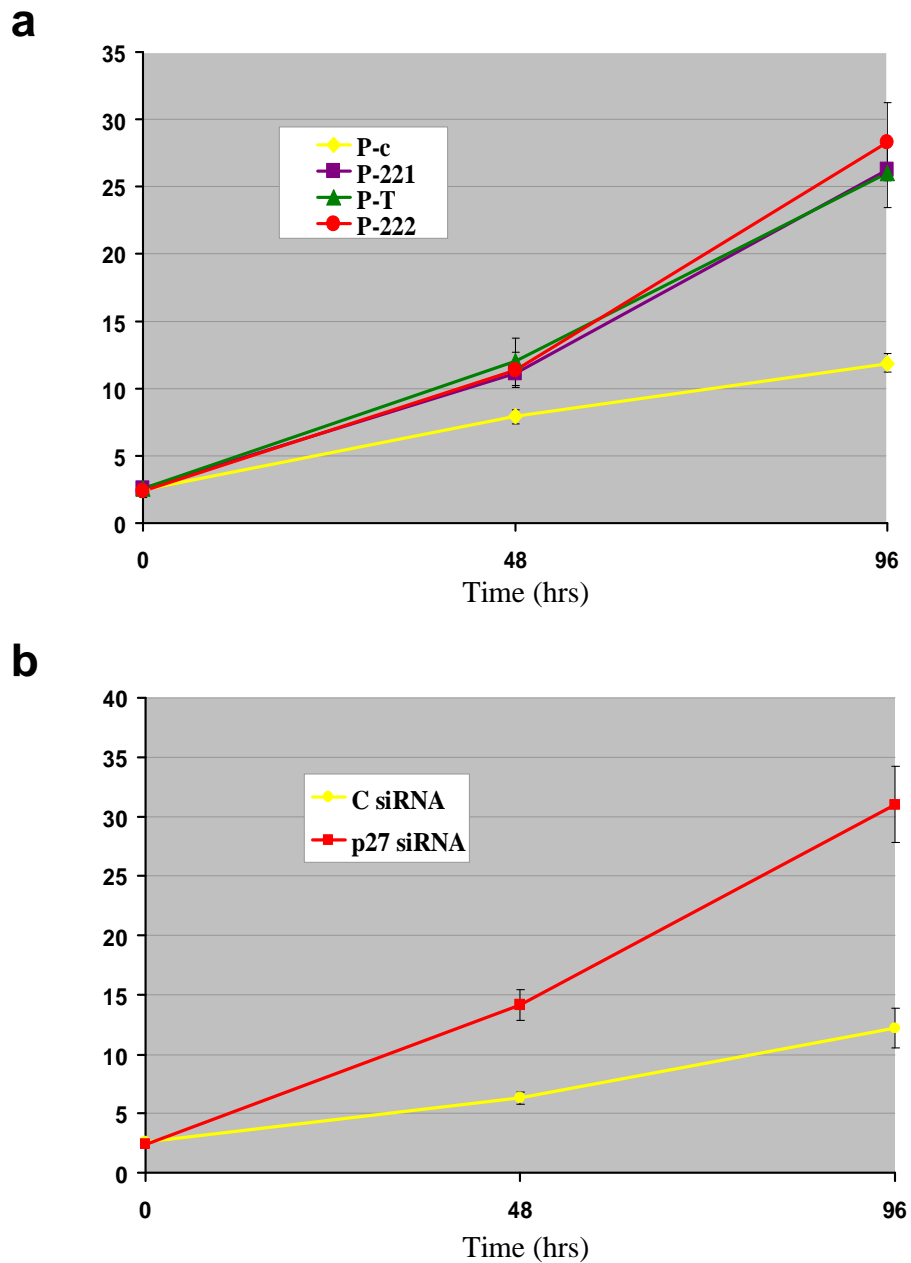


Figura 8. Saggio MTS per l'analisi della crescita cellulare in LNCaP stabilmente trasfettate a) con i plasmidi p-221, p-222, p-T e p-C (controllo) e b) con un siRNA anti-p27 (p27 siRNA) e con un siRNA di controllo (C siRNA) ideato per non colpire alcuna sequenza del genoma di mammifero. Sulle asse delle ordinate sono rappresentati i numeri di cellule totali $\times 10^3$.

Come è mostrato nella figura 9a quest'analisi ha rivelato che le cellule LNCaP esprimenti miR-221, miR-222 o il cluster contenente miR-221 e 222 presentano un incremento significativo della popolazione cellulare in fase S (+11% rispetto alle cellule trasfettate con il plasmide vuoto di controllo), con una conseguente diminuzione della porzione di cellule in fase G1 (vedi tabella 1).

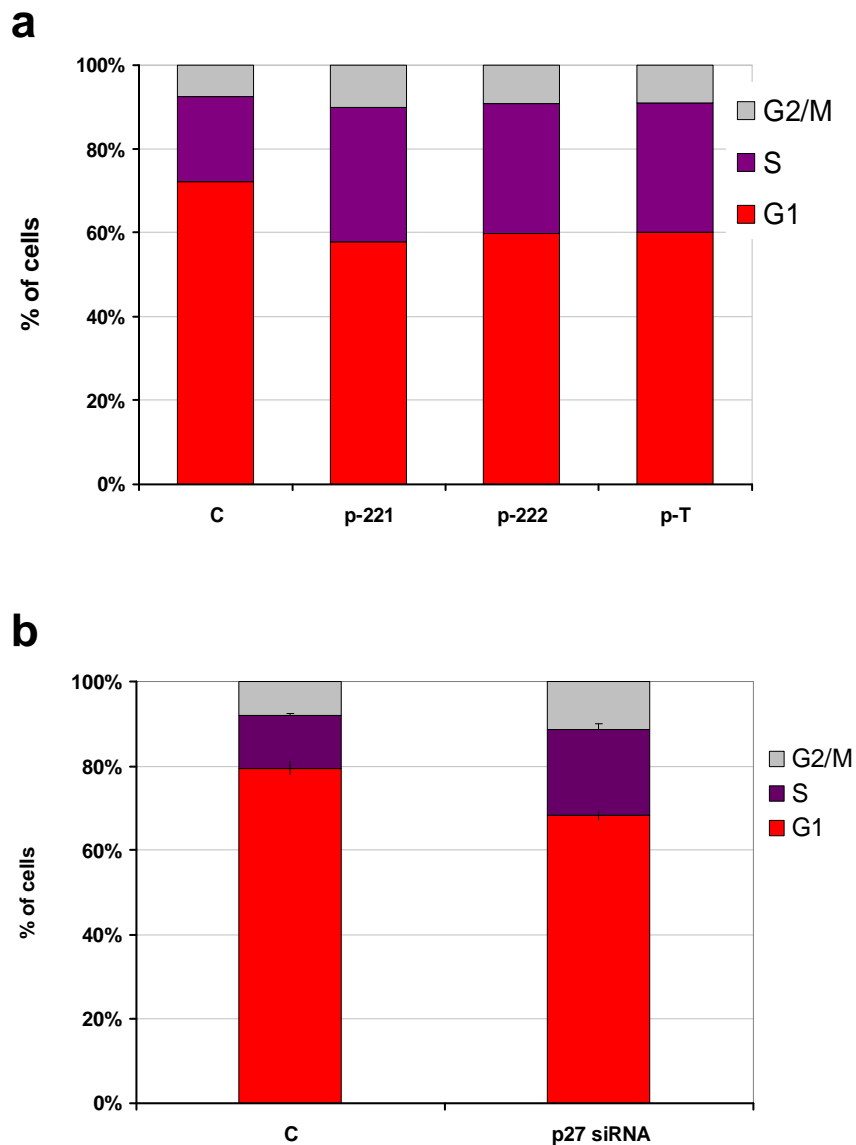


Figura 9. Analisi al FACS per lo studio della distribuzione nelle varie fasi del ciclo cellulare di cellule LNCaP trasfettate a) con p-221, p-222, p-T e p-C(C), b) con un siRNA anti-p27 (p27 siRNA) e con un siRNA di controllo (C).

Come per i saggi di crescita cellulare, l'utilizzo di un siRNA anti-p27 produce anche in questo caso un risultato molto simile a quello ottenuto con la trasfezione dei microRNA (figura 9b; tabella 1).

Questi risultati mostrano la capacità dei microRNA 221 e 222 di regolare l'arresto del ciclo cellulare mediato da p27, supportandone il ruolo di regolatori negativi per questo stesso gene.

	C	p-221	p-222	p-T		C	p27 siRNA
G1	71%	57%	59%	59.5%	G1	79.5%	69%
S	20%	31%	31%	31%	S	12.5%	20.5%
G2/M	7.5%	10%	9%	9%	G2/M	8%	11.5%

Tabella 1. Analisi dei dati in termini percentuali di distribuzione nelle varie fasi del ciclo cellulare delle cellule LNCaP trasfettate con p-221, p-222, p-T e p27 siRNA.

L'espressione ectopica di miR-221 e/o miR-222 incrementa il potenziale clonogenico di cellule LNCaP, mentre la sottoespressione di entrambi i microRNA nelle cellule PC3 riduce sensibilmente la loro capacità clonogenica

Una caratteristica molto importante della trasformazione cellulare è rappresentata dalla capacità di crescere in maniera indipendente dall'ancoraggio in un terreno di coltura

semisolido. Per analizzare i possibili effetti dell'espressione di miR-221 e 222 anche su questa proprietà cellulare, cellule LNCaP trasfettate con i plasmidi esprimenti i nostri microRNA, sono state seminate in un terreno contenente soft agar e le colonie formatesi sono state contate. Come si può osservare nella figura 10, le cellule LNCaP che esprimono in maniera stabile miR-221 o miR-222, formano un numero molto più abbondante di colonie se confrontate con le cellule di controllo trasfettate con il plasmide vuoto (118 ± 9.5 contro $37.5, \pm 6.9$ per miR-221, e 146 ± 15.6 per miR-222). Questo risultato dimostra che la riduzione di p27 causata dall'azione regolatoria di questi due microRNA influenza fortemente un'altra tipica caratteristica della capacità di crescita delle cellule tumorali.

A corollario di questo esperimento, l'effetto dell'espressione di miR-221 e 222 sul potenziale clonogenico di queste stesse cellule è stato confrontato con quello di un siRNA anti-p27 sul potenziale clonogenico di queste stesse cellule. Le colonie formate da cellule trasdotte con il RNA interferente che determina la degradazione del mRNA di p27, sono risultate molto più numerose rispetto a quelle formate da cellule trasfettate con un siRNA di controllo, come si può osservare dal grafico a destra e dal pannello della figura 10. Così come per gli esperimenti di proliferazione, qualunque sia il tipo di piccolo RNA utilizzato, sia che si tratti di un siRNA o di un microRNA, l'andamento del risultato ottenuto è stato del tutto simile, ad ulteriore conferma dell'ipotesi che lega l'azione di miR-221 e 222 alla potenzialità tumorigenica delle cellule di carcinoma prostatico attraverso la specifica inibizione di p27.

Al contrario nelle cellule PC3, endogenamente dotate di un buon livello di espressione di miR-221 e miR-222, l'abbassamento di espressione di quest'ultimi, ottenuto tramite trasfezione con specifici oligonucleotidi antisenso (LNA oligo), è stato capace di indurre una forte riduzione (4,5 volte) del numero di colonie in confronto a quello delle cellule di controllo trasfettate con un LNA oligo disegnato per non appaiare nessuna sequenza di microRNA di mammifero (Figura 11). Questo risultato che, come è stato precedentemente osservato, è una diretta conseguenza dell'aumentata espressione di p27 (vedi figura 6),

fornisce un'ulteriore evidenza funzionale sui cambiamenti delle proprietà cellulari mediati dall'espressione di miR-221 e 222 sul controllo di espressione della proteina p27.

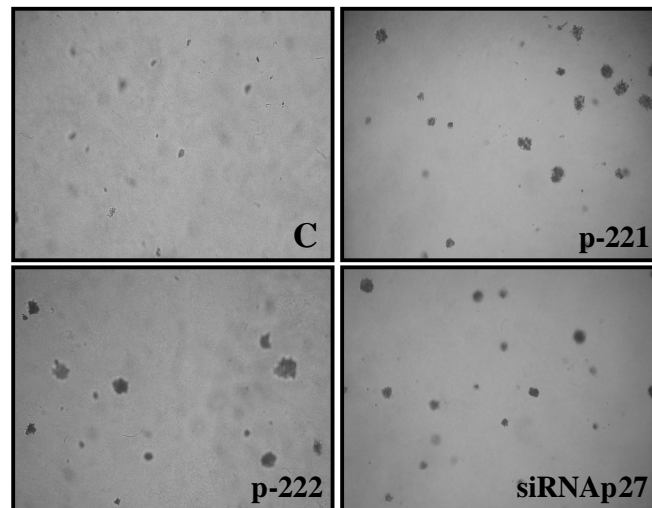
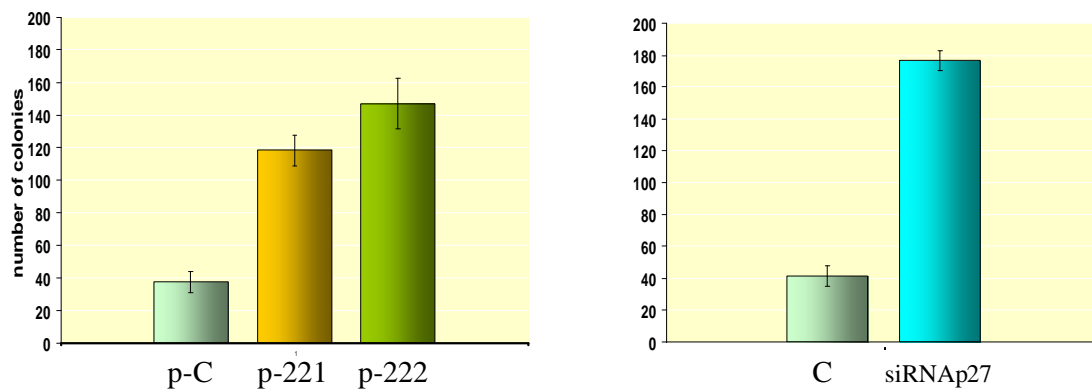


Figura 10. Risultati del saggio *soft agar* per misurare la capacità di crescita indipendente dall'ancoraggio di cellule LNCaP trasfettate con (grafico di sinistra) p-221, p-222 o p-C e con (destra) un siRNA anti-p27 o un siRNA di controllo (C). Sono state contate le colonie con un diametro superiore a 0,1 mm. Nel pannello sottostante è mostrata una microfotografia rappresentativa per ogni tipo cellulare (magn.=10x)

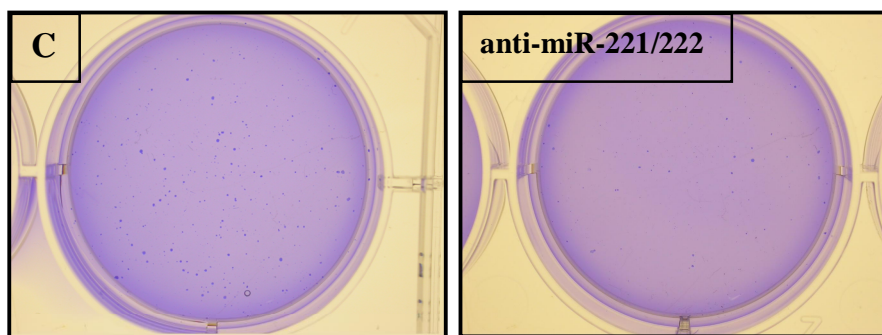
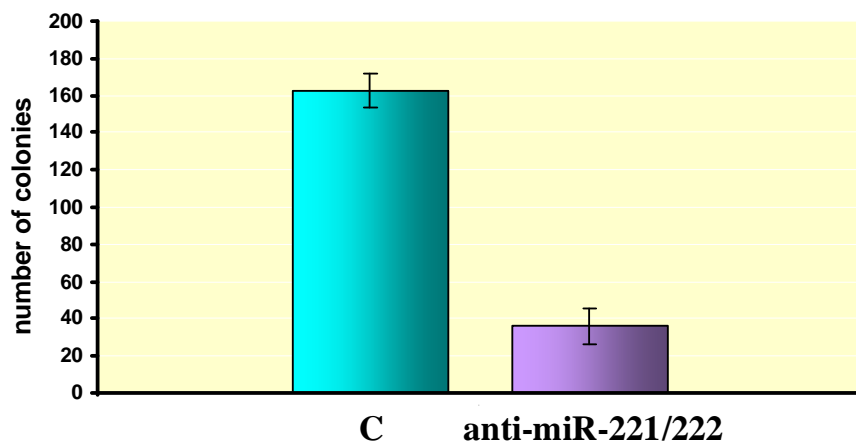


Figura 11. Risultati del saggio *soft agar* su cellule PC3 trasfettate con LNA oligonucleotidi anti miR-221 e anti miR-222 o con LNA oligonucleotidi di controllo disegnati contro un microRNA di *A. thaliana* (C). Sono state contate le colonie con diametro più grande di 0,15 mm. Nel pannello in basso sono mostrate due immagini rappresentative dell'esperimento.

Cellule LNCaP stabilmente esprimenti il miR-221 inoculate per via sottocutanea in topi SCID producono tumori sensibilmente più grandi dei tumori di controllo.

Per testare se l'espressione ectopica del microRNA 221 induce un incremento della tumorigenicità delle cellule di carcinoma della prostata anche *in vivo*, è stato condotto un esperimento di iniezione sottocutanea in topi immunodeficienti SCID di cellule LNCaP trasdotte stabilmente con p-221 e, l'andamento della crescita tumorale è stata seguita e confrontata con quella di tumori originati da iniezioni di cellule trasfettate con il plasmide vuoto.

Come è mostrato nel grafico della figura 12a, al momento del sacrificio l'incremento medio dei tumori generati dall'iniezione di cellule LNCaP che overesprimono il miR-221 risulta essere molto maggiore ($107 \pm 58,2$ volte) di quello misurato nei tumori provenienti dalle cellule di controllo, che è pari a 4 ± 2 volte. Sebbene la deviazione standard misurata sia elevata, a causa principalmente della grande variabilità individuale della crescita tumorale di ogni singolo topo (evento), il risultato ottenuto risulta essere lo stesso statisticamente significativo.

Questo dato è inoltre confermato dalla misurazione della crescita tumorale nel tempo di ogni singolo animale che ha ricevuto un inoculo di cellule LNCaP esprimenti il microRNA 221 su un fianco e di cellule di controllo sul fianco opposto. La figura 12b rappresenta infatti la curva di crescita prodotta dalle misurazioni del volume dei tumori così generati di un topo preso come esempio esplicativo e mostra in maniera evidente come l'induzione di espressione del miR-221 determini un sostanziale incremento del volume tumorale (più di 3000 mm^3 rispetto ai $98,3$ del controllo negativo a 82 giorni dall'inoculo).

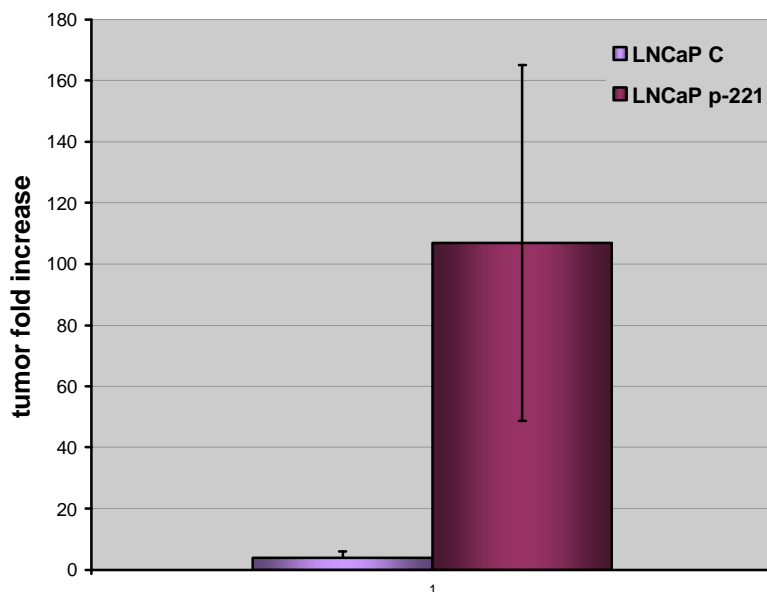
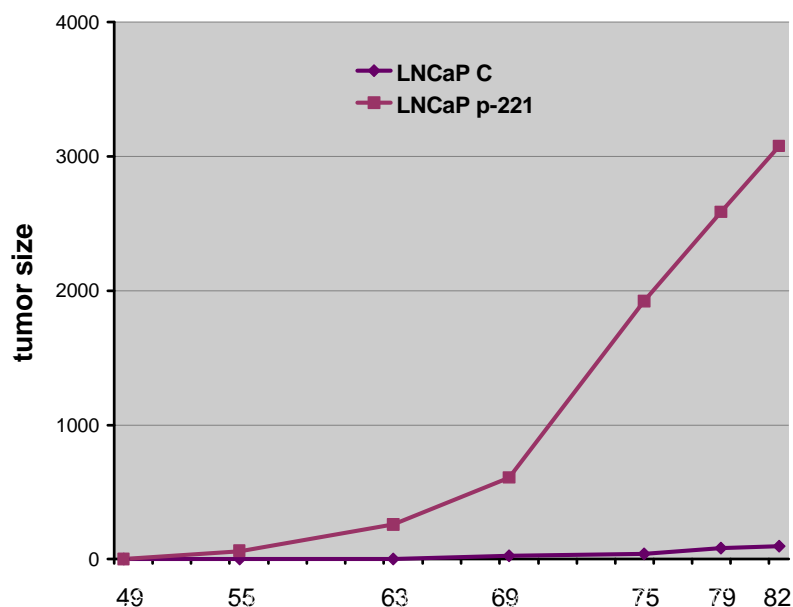
a**b**

Figura 12. a) Tasso di crescita tumorale di cellule LNCaP stabilmente esprimenti o non il miR-221 iniettate sotto cute in topi SCID. Sull'asse delle ordinate è mostrato l'incremento medio dei volumi tumorali al momento del sacrificio rispetto alla prima misurazione. Il grafico mostra i valori medi \pm la deviazione standard di 7 campioni per gruppo sperimentale. b) Curva di crescita tumorale misurata dopo l'iniezione sottocutanea di LNCaP trasfettate con p-221 o con il plasmide di controllo (C). Sull'asse delle ascisse sono indicati i giorni trascorsi dal momento dell'inoculo. L'analisi si riferisce ad un singolo esperimento esemplificativo di sette in cui l'andamento osservato è stato per tutti simile. Il volume del tumore è misurato in mm³

La differenza sostanziale di crescita dei tumori sovraesprimenti il miR-221 rispetto ai tumori di controllo poteva essere una conseguenza di un iniziale vantaggio di crescita, mantenuto nel tempo anche nel caso di un eventuale silenziamento ectopico di miR-221, oppure poteva essere stata innescata ma anche poi sostenuta nel tempo da una continua overespressione di miR-221. Per discriminare tra queste due ipotesi, è stata condotta un'analisi molecolare sui tumori prelevati dopo l'ultima misurazione che ha indicato che i livelli di espressione di miR-221, analizzati tramite Northern Blot, risultavano ancora molto abbondanti al momento del sacrificio, nei tumori derivati da cellule LNCaP stabilmente trasfettate con p-221 (Figura 13).

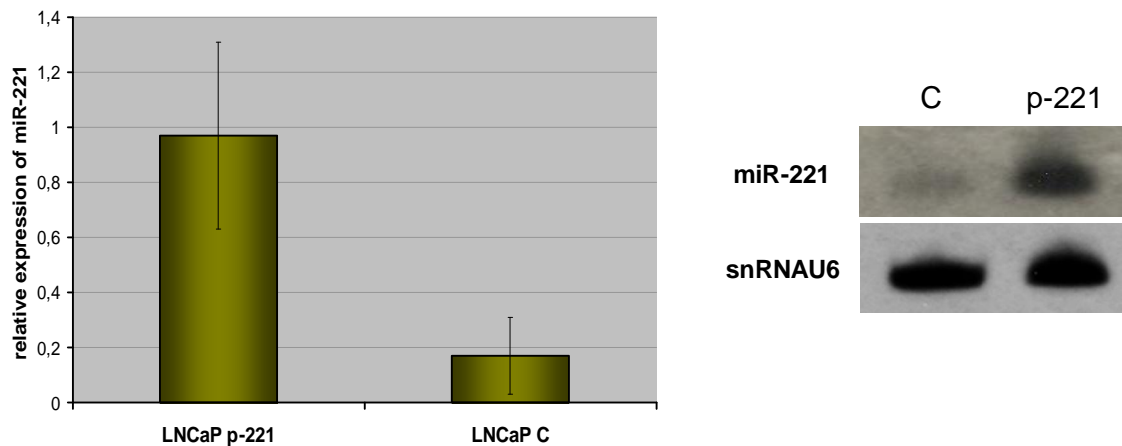


Figura 13. Espressione relativa di miR-221 (Northern blot) dei tumori generati dagli inoculi sottocutanei in topi SCID di cellule LNCaP stabilmente trasfettate con p-221 o con il plasmide vuoto di controllo (LNCaP C). I valori si riferiscono alle medie \pm le deviazioni standard di 7 campioni per gruppo sperimentale. Nella parte destra della figura è mostrata un'immagine rappresentativa del Northern blot riferito ad un singolo esperimento. Il piccolo RNA nucleare U6 è stato utilizzato come controllo di isocaricamento.

Per chiarire inoltre se anche in questo modello in vivo fosse possibile ricostruire la correlazione inversa tra miR-221 e p27, e unirla con i dati di crescita tumorale, l'espressione

di p27 nei tumori è stata misurata mediante Western Blot su estratti proteici totali dei tumori. Come chiaramente indicato nella figura 14 la quantità totale di proteina p27 nei campioni tumorali esprimenti il miR-221 risulta essere ridotta di circa più di tre volte rispetto a quella misurata nei tumori di controllo.

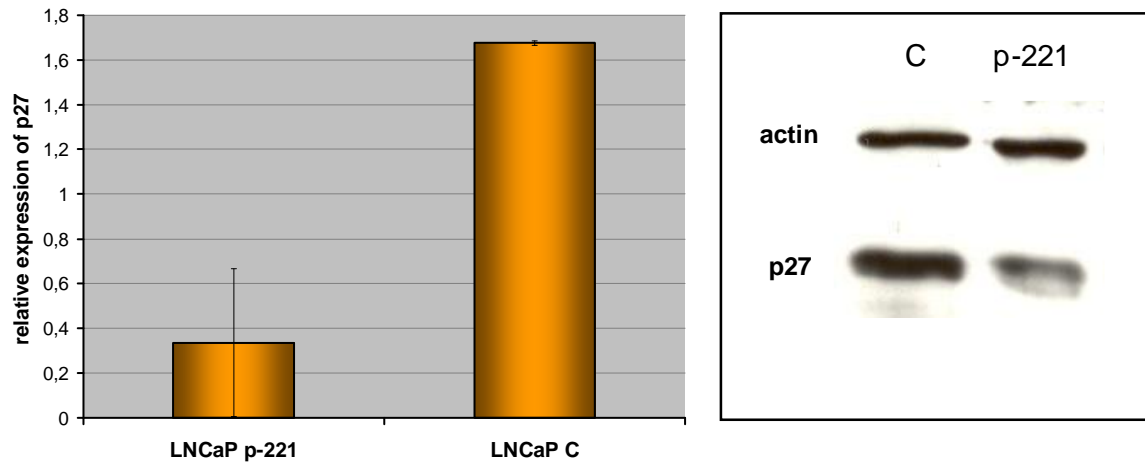


Figura 14. Analisi dei livelli di espressione di p27 in tumori generati dagli inoculi sottocutanei in topi SCID di cellule LNCaP stabilmente esprimenti o non (C) il miR-221 (p-221). I valori si riferiscono alle medie \pm le deviazioni standard di 7 campioni per gruppo sperimentale. Nella riquadro a destra della figura, è mostrata un'immagine rappresentativa del Western blot riferito ad un singolo esperimento. I livelli di actina sono stati utilizzati come controllo dell'isolamento.

Insomma dei dati derivati da questo esperimento in vivo, indica che la sola espressione ectopica di miR-221, sostenuta anche a lungo termine dal plasmide qui impiegato, è sufficiente per indurre un grande vantaggio in termini di crescita ai tumori generati dall'inoculo sottocutaneo delle cellule LNCaP così trasdotte, e che questo stesso vantaggio è la conseguenza diretta della forte riduzione dei livelli proteici di p27 operata dal miR-221.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In questi ultimi anni, un numero sempre più grande di evidenze sperimentali ha correlato l'espressione dei microRNA a varie forme di cancro umano, definendone un possibile ruolo nello sviluppo e progressione tumorale. Sebbene gran parte della ricerca scientifica abbia riversato molte delle proprie forze nel tentativo di identificare i bersagli molecolari che vengono regolati da specifici microRNA associati alla patologia cancerosa, solamente una piccola parte di questi è stata fino ad oggi individuata. L'importanza di quest'analisi consiste nel fatto che l'identificazione del mRNA bersaglio di uno specifico microRNA consentirebbe di risalire al processo cellulare in cui il microRNA stesso è coinvolto, fornendo la piena comprensione del suo ruolo funzionale nell'oncogenesi.

I risultati ottenuti riguardo alla coppia di microRNA 221 e 222 sembrano proprio chiarire in maniera esaustiva il meccanismo d'azione mediante il quale questi due microRNA esplicano la loro azione di regolatori positivi della progressione dell'adenocarcinoma prostatico. Il lavoro, infatti, si basa sull'osservazione iniziale che questa coppia di microRNA, codificati in tandem da un cluster localizzato sul cromosoma X, presentano un'espressione differenziale in modelli cellulari di carcinoma della prostata associati a differenti stadi della progressione di questa neoplasia (Webber *et al.*, 1997); sono infatti abbondantemente espressi nella linea cellulare PC3, derivata da un tumore molto aggressivo, mentre al contrario, risultano essere assenti o scarsamente presenti in cellule 22Rv1 ed LNCaP derivate da neoplasie molto meno aggressive e correlate a stadi molto più precoci dello sviluppo tumorale. Per questo motivo abbiamo ipotizzato che l'espressione di miR-221 e miR-222 nelle cellule PC3 potesse essere considerata come un marcatore molecolare di incremento del loro potenziale tumorigenico. Questa ipotesi è stata rafforzata ancor di più dalla dimostrazione che uno dei bersagli molecolari, la cui espressione risulta essere modulata da entrambi i microRNA nelle cellule di cancro della prostata, è p27, un noto oncosoppressore

coinvolto nella regolazione del ciclo cellulare. Tramite studi bioinformatici seguiti dal *saggio della luciferasi*, che rappresenta un test *in vitro* valido per l'identificazione dei bersagli molecolari dei microRNA, abbiamo dimostrato che sulla regione 3' UTR di p27 esistono due siti che vengono riconosciuti e legati in maniera specifica sia da miR-221 che da miR-222. In accordo con questo è stato osservato che nelle linee cellulari da noi analizzate i livelli di espressione di p27 mostrano una correlazione inversa con quelli dei due microRNA: le cellule PC3 presentano bassi livelli di p27, mentre abbondanti sono quelli riscontrati nelle cellule LNCaP e 22Rv1. Inoltre la modulazione dei due microRNA da noi indotta, che consiste nell'overespressione nelle LNCaP e nelle 22Rv1 e nell'inibizione nelle PC3, induce l'effetto opposto sui livelli quantitativi di p27, confermando ancora una volta l'esistenza di una correlazione specifica fra i nostri due microRNA e questa proteina nell'ambiente cellulare del carcinoma della prostata.

Nel nostro lavoro forniamo anche numerose evidenze funzionali riguardo al ruolo di miR-221 e 222 nello sviluppo tumorale, mostrando che l'espressione ectopica di questi ultimi è sufficiente ad indurre un marcato incremento del potenziale di crescita delle cellule LNCaP. Questo effetto rappresenta una diretta conseguenza del passaggio dalla fase G1 ad S del ciclo cellulare in accordo con il ruolo principale di p27 come regolatore specifico della transizione G1/S, e viene accompagnato da un sensibile aumento nella capacità di crescita indipendente dall'adesione, considerata una caratteristica essenziale delle cellule cancerose. Il potenziale clonogenico, e quindi tumorigenico, dunque risulta fortemente incrementato quando miR-221 e miR-222 vengono overespressi sia *in vitro* che *in vivo* nelle cellule LNCaP, mentre al contrario viene ridotto consistentemente nel momento in cui l'espressione dei due microRNA in cellule PC3 è inibita dall'utilizzo di specifici oligonucleotidi antisense LNA.

I risultati qui descritti si rivelano particolarmente interessanti perché tra i fattori la cui espressione risulta essere modulata nella progressione del carcinoma prostatico, spicca proprio p27 (Macri *et al.*, 1998; Slingerland *et al.*, 200). Questo gene oncosoppressore è

oramai considerato un marcatore molecolare importante nella prognosi tumorale: è infatti stato dimostrato che la diminuzione dei suoi livelli di espressione è correlata con un alto grado di tumorigenicità sia nel caso del carcinoma prostatico che in un'ampia varietà di tumori umani (Tsihlias *et al.*, 1999; Macri *et al.*, 1998; Lloyd *et al.*, 1999; Cheville *et al.*, 1998; Tsihlias *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998). Nel contesto specifico della patologia del cancro prostatico, la riduzione dei livelli di espressione della proteina p27 sembra essere associata agli eventi precoci dell'oncogenesi come è frequentemente osservato nell'atrofia infiammatoria prostatica (PIA) che, come è stato ampiamente descritto nella parte introduttiva di questo studio, viene considerata come uno stadio precursore delle lesioni che precedono lo sviluppo del tumore (De Marzo *et al.*, 1999). Inoltre per l'interpretazione dei nostri dati, bisogna senza dubbio tener conto del fatto che p27 è un oncosoppressore aploinsufficiente con attività dipendente dal dosaggio, a differenza di altri geni come ad esempio p53 o pRb dei quali è necessaria la completa assenza per l'attivazione delle vie che conducono alla tumorigenesi. Infatti, nei tumori umani i livelli proteici di p27 risultano per lo più essere ridotti e solo raramente sono osservati casi di inattivazione dovute a mutazioni puntiformi con perdita di eterozigosi. Queste caratteristiche sembrano essere in perfetta sintonia con il meccanismo d'azione tipico dei microRNA che esercitano la loro funzione regolatoria modulando negativamente l'espressione del loro gene bersaglio, e non inibendolo completamente.

Inoltre la presenza di questa stessa proteina viene controllata sia in condizioni fisiologiche che patologiche da una serie di meccanismi di regolazione post-trascrizionali (Alessandrini *et al.*, 1997; Kardinal *et al.*, 2006; Chu *et al.*, 2007; Grimmmler *et al.*, 2007) fra i quali spiccano il sequestro da parte del complesso ciclina D/CDK4, la degradazione mediata dal proteasoma e la ritenzione citoplasmatica (Koff, 2006).

Dunque, l'effetto di regolazione *fine-tuning* esercitato dai nostri due microRNA sui livelli di espressione di p27 che abbiamo osservato nei modelli cellulari di carcinoma della prostata, potrebbe essere considerato un altro importante tassello del puzzle molecolare atto a garantire la modulazione quantitativa di p27, che potrebbe essere affiancato a tutti gli altri meccanismi post-trascrizionali coinvolti nella regolazione di questo importante oncosoppressore.

Un punto essenziale nella chiave di lettura dei risultati ottenuti in questo lavoro viene fornito dalle numerose evidenze riscontrate in letteratura riguardo alla sovraespressione di miR-221 e miR-222 in molte specie di tumori differenti, la maggior parte dei quali risulta essere anche caratterizzata dalla perdita di livelli fisiologici di espressione di p27.

I miR-221 e 222 sono regolati in maniera positiva nei tumori solidi del colon, del pancreas e dello stomaco (Volinia *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006), oltre ad essere sovraespressi più di dieci volte nel carcinoma papillare tiroideo (He *et al.*, 2005). Inoltre miR-222 da solo è un marcatore molecolare del carcinoma epatocellulare scarsamente differenziato, e infatti i suoi livelli sembrano essere dieci volte aumentati rispetto ai casi più differenziati dello stesso tumore (Murakami *et al.*, 2006). La sovraespressione di miR-221 e 222 è stata inoltre descritta in una forma di tumore non solido, la leucemia linfoide cronica (CLL), e correlata ad una cattiva prognosi di questo tipo di patologia (Calin *et al.*, 2005). Sempre in questa direzione convergono i dati ottenuti dal nostro gruppo e da altri autori (le Sage *et al.*, 2007) che dimostrano che la sovraespressione di questi due microRNA riscontrata nei pazienti affetti da glioblastoma multiforme (Ciafrè *et al.*, 2005) risulta essere in correlazione con la riduzione di p27, suggerendo l'esistenza di questa relazione anche in tipi tumorali differenti dall'adenocarcinoma prostatico.

Dunque, mentre numerosi sembrano essere i dati che supportano il ruolo di questi due microRNA nello sviluppo e progressione del tumore, in soli tre casi la modulazione di miR-221 e 222 era stata fino ad ora descritta e affiancata all'identificazione di un loro specifico

bersaglio molecolare, il recettore tirosin-chinasico KIT. In uno di questi lavori, che è anche l'unico nella letteratura scientifica in cui è stata osservata una relazione fra sottoespressione dei miR 221 e 222 e cancro, in maniera specifica delle linee cellulari di leucemia eritrocitica, appare essere definita in maniera chiara la correlazione fra la suddetta riduzione di espressione dei due microRNA e l'aumento dei livelli di KIT (Felli *et al.*, 2005). Anche nel carcinoma papillare tiroideo la sovraespressione di questi due microRNA in tandem induce una diminuzione dei livelli di espressione del recettore KIT (He *et al.*, 2005). Nel terzo caso descritto, l'overespressione di miR-221 e miR-222 in cellule epiteliali HUVEC contribuisce fortemente alla riduzione della loro capacità angiogenica in risposta al fattore delle cellule staminali (SCF); questo effetto è ancora una volta associato alla loro azione sull'inibizione di c-Kit (Poliseno *et al.*, 2006), suggerendo che questi due microRNA possano avere un ruolo nella modulazione della formazione di nuovi vasi sia in condizioni fisiologiche che patologiche.

L'identificazione di p27 come un altro bersaglio molecolare della coppia di microRNA 221 e 222 nei modelli di carcinoma prostatico e quindi in un contesto biologico molto differente da quelli fino ad oggi riportati in letteratura, non sembra discostarsi affatto dalla modalità di azione con cui i microRNA esercitano la loro funzione di regolatori dell'espressione genica in maniera fine, sensibile e dinamica. Per l'interpretazione del ruolo dei microRNA nei processi cellulari, non bisogna cadere nell'errore di immaginare un sistema biologico chiuso e statico: è stato infatti ampiamente descritto che la relazione fra microRNA e RNA messaggeri target non sia del tipo "uno ad uno", così che uno specifico mRNA bersaglio può venir riconosciuto e regolato da più microRNA. La scelta di quali e quanti microRNA siano coinvolti nella regolazione di una 3'UTR è determinata dallo specifico ambiente cellulare nel quale ci si trova (Meltzer, 2005). Di conseguenza un microRNA che presenta due bersagli molecolari con funzione completamente opposta, potrebbe agire da oncosoppressore in

alcuni tipi di cancro e da oncogene in altri, a seconda di quale dei due target venga deregolato in ognuno dei due specifici ambienti cellulari.

Queste osservazioni convergono tutte insieme verso l'identificazione per l'azione dei microRNA di un meccanismo regolatorio veloce e dinamico, ad ampio spettro d'azione, sensibile agli stimoli ed ai cambiamenti dell'ambiente circostante, che sembra essere perfettamente in linea con tutte le esigenze di una cellula non solo in condizioni fisiologiche ma anche in quelle patologiche come ad esempio nella trasformazione maligna.

I risultati ottenuti in questo lavoro che definiscono *in vitro* ed ancora solo parzialmente *in vivo* una relazione diretta fra due specifici microRNA il cui target molecolare è un oncosoppressore, e la progressione del carcinoma della prostata, potrebbero gettare le basi per lo sviluppo di una terapia genica atta ad inibire l'espressione degli stessi microRNA con conseguente induzione del blocco dello sviluppo tumorale. Per fare questo, il primo passo sarebbe sicuramente rappresentato dall'utilizzo di una metodica di somministrazione di oligonucleotidi sintetici con sequenze complementari a quelle di miR-221 e 222, che come è stato descritto nella sezione dei risultati di questo studio sono in grado di abbassare sensibilmente i livelli di espressione di entrambi i microRNA. Recentemente è stato descritto l'impiego di *antagomir*, oligonucleotidi antisenso coniugati al colesterolo disegnati contro la sequenza di specifici microRNA che, inoculati *in vivo*, in modelli murini, hanno efficacemente inibito l'espressione dei microRNA endogeni in diversi organi bersaglio. Inoltre è stato dimostrato che è sufficiente un inoculo intravenoso per ottenere un'efficiente distribuzione degli antagomir agli organi bersaglio e la conseguente inibizione dei microRNA prescelti (Kruzfeldt *et al.*, 2005). Alla luce di questi risultati, i dati ottenuti fino ad oggi potrebbero rivelarsi molto importanti nel tentativo di individuare una terapia specifica volta all'inibizione della crescita e dello sviluppo del carcinoma della prostata. Di notevole importanza risulta per questo fine l'evidenza sperimentale da noi ottenuta che l'induzione di espressione del miR-221 in cellule LNCaP determina un sensibile incremento

della crescita dei tumori originati dall'iniezione sottocutanea in topi immunodepressi di queste stesse cellule, perché costituisce una base teorica da cui prendere spunto per l'ideazione di esperimenti in cui al contrario lo scopo sarebbe quello di inibire l'espressione dei due microRNA in tumori originati dall'inoculo di cellule PC3. Per fare questo ci si potrebbe avvalere dell'utilizzo della metodica degli antagomir, disegnando un vero e proprio protocollo sperimentale di terapia genica in cui questi ultimi siano direttamente somministrati nel tumore, con la speranza che la loro azione regolatoria possa influenzare in maniera negativa la crescita tumorale.

Allo stesso tempo risulterebbe di notevole interesse dal punto di vista clinico verificare che il profilo di espressione di miR-221 e 222 correli anche *in vivo* con la crescita e lo sviluppo dell'adenocarcinoma prostatico. Un riscontro positivo di questa analisi, che dovrebbe essere condotta su tessuti tumorali associati a differenti stadi di sviluppo di pazienti affetti da tale neoplasia, garantirebbe uno sviluppo futuro per la nostra linea di ricerca perché potrebbe identificare questi due microRNA come marcatori biologici della progressione di questo specifico tipo di patologia, con tutte le conseguenti prospettive a livello terapeutico e diagnostico che ne potrebbero derivare.

BIBLIOGRAFIA

Altomaa S., Lipponen P., Eskelinen M., ala-Opas M., Kosma VM. Prognostic value and expression of p21 (waf1/cip1) protein in prostate cancer. *Prostate*. 39(1):8-15, 1999

Alessandrini A., Chiaur DS., Pagano M. Regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 by degradation and phosphorylation. *Leukemia*. 11(3):342-5, 1997

Alkarain A., Jordan R and Slingerland J. p27 deregulation in breast cancer: prognostic significance and implications for therapy. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 9(1):67-80, 2004

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell*. 116:281-97, 2004

Bentwich I., Avniel A., Karov Y., Aharonov R., Gilad S., Barad O., Barzilai A., Einat P., Einav U., Meiri E., Sharon E., Spector Y., Bentwich Z. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet*. 37(7):766-70, 2005

Berezikov E., Guryev V., van de Belt JW., Wlenholds E., Plasterk RH., Cuppen E. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell*. 120:21-24, 2005

Berges RR., Vukanovic J., Epstein JI., CarMichel M., Cisek L., Johnson DE., Veltri RW., Walsh PC., Isaacs JT. Implication of cell kinetic changes during the progression of human prostatic cancer. *Clin Cancer Res*. 1(5):473-80, 1995

Bernstein E., Caudy AA., Hammond SM., Hannon JL. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 409:363-366, 2001

Bohem M., Yoshimoto Y., Crook MF., Nallamshetty S., True A., Nabel GJ., Nabel EG. A growth factor-dependent nuclear kinase phosphorylates p27 (Kip1) and regulates cell cycle progression. *EMBO J*. 21:3390-3401, 2002

Bookstein R., MacGrogan D., Hilsenbeck SG., Sharkey F., Allred DC. P53 is mutated in a subset of advanced-stage prostate cancers. *Cancer Research*. 53:3369-73, 1993

Calin G. and Croce CM. MicroRNA signatures in human cancer. *Nature Rev*. 6:857-66, 2006

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. *PNAS*. 101:2999-3004, 2004

Calin GA., Dumitru CD., Shimizu M., Bichi R., Zupo S., Noch E., Aldler H., Rattan S., Keating M., Rai K., Rassenti L., Kipps T., Negrini M., Bullrich F., Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q 14 in chronic lymphocytic leukaemia. *PNAS*. 99:15524-29, 2002

Calin GA., Ferracin M., Cimmino A., Di Leva G., Shimizu M., Wojcik SE., Iorio MV., Visone R., Sever NI., Fabbri M., Iuliano R., Palombo T., Pichiorri F., Roldo C., Garzon R., Sevignani C., Rassenti L., Alder H., Volinia S., Liu CG., Kipps TJ., Negrini M., Croce CM. A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukaemia. *N. Engl. J. Med.* 353:1793-1801, 2005

Carmell MA. and Hannon GJ. RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nature Struct. Mol. Biol.* 11:214-18, 2004)

Casaccia-Bonnet P., Tikoo R., Kiyokawa H., Friedrich Jr V., Chao MV., Koff A. Oligodendrocyte precursor differentiation is perturbed in the absence of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 kip1. *Genes Dev.* 11:2335-46, 1997

Chan JA., Krichevsky AM., Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 65(14):6029-33, 2005

Chen H., Nandi AK., Li X., Bieberich CJ. NKX-3.1 interacts with prostate-derived Ets factor and regulates the activity of the PSA promoter. *Cancer Research.* 62:338-40, 2002

Chen Y., Martinez LA., LaCava M., Coghlan L., Conti CJ. Increased cell growth and tumorigenicity in human prostate LNCaP cells by overexpression of Cyclin D1. *Oncogene.* 16:1913-20, 1998

Cheville JC., Lloyd RV., Sebo TJ., Cheng L., Erickson L., Bostwick DG., Lohse CM., Wollan P. Expression of p27kip1 in prostatic adenocarcinoma. *Mod Pathol.* 11(4):324-8, 1998

Chu I., Sun J., Arnaout A., Kahn H., Hanna W., Narod S., Sun P., Tan CK., Hengst L., Slingerland J. p27 phosphorylation by src regulates inhibition of cyclin E-Cdk2. *Cell.* 128:281-294, 2007

Ciafrè S.A., Galardi S., Mangiola A., Ferracin M., Liu C.-G., Sabatino G., Negrini M., Maira G., Croce C.M., Farace M.G. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 334(4):1351-8, 2005

Cimmino A., Calin GA., Fabbri M., Iorio MV., Ferracin M., Shimizu M., Wojcik SE., Aqeilan RI., Zupo S., Dono M., Rassenti L., Alder H., Volinia S., Liu CG., Kipps TJ., Negrini M., Croce CM. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *PNAS.* 102:13944-49, 2005

Clurman BE. and Hayward WS. Multiple proto-oncogene activations in avian leucosis virus-induced lymphomas: evidence for stage-specific events. *Mol. Cell. Biol.* 9:2657-64, 1989

Cookson MM. Prostate cancer: screening and early detection. *Cancer Control.* 8(2):133-40, 2001

Del Sal G., Loda M., Pagano M. Cell cycle and cancer: critical events at the G1 restriction point. *Crit Rev Oncog.* 7:127-42, 1996

De Marzo AM., Marchi VL., Epstein JL., Nelson WG. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am J Pathol.* 155(6):1985-92, 1999

Dinjens WN., van der weiden NM., Schroeder FH., Bosman FT., Trapman J. Frequency and characterization of p53 mutations in primary and metastatic human prostate cancer. *Int J Cancer.* 56:630-3, 1994

Drobnjak M., Osman I., Scher HL., Fazzari M., Cordon-Cardo C. Overexpression of Cyclin D1 is associated with metastatic prostate cancer to bone. *Clinical Cancer Research.* 6(5):1891-5, 2000

Doench JG., Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* 18:504-11, 2004.

Eis PS., Tam W., Sun L., Chadburn A., Li Z., Gomez MF., Lund E., Dahlberg JE. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *PNAS* 102:3627-32, 2005

Esquela-Kerscher A. and Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev.* 6:259-69, 2006

Felli N., Fontana L., Pelosi E., Botta R., Bonci D., Facchiano F., Liuzzi F., Lulli V., Morsili O., Santoro S., Valtieri M., Calin GA., Liu CG., Sorrentino A., Croce CM., Peschle C. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *PNAS.* 102(50):18081-6, 2005

Filipowicz W., Jaskiewicz L., Kolb FA., Pillai RS. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15(3):331-41, 2005

Ganoth D., Bornstein G., Ko TK., Larsen B., Tyers M., Pagano M., Hershko A. The cell-cycle regulatory protein Cks1 is required for SCF(Skp2)-mediated ubiquitinylation of p27. *Nat Cell Biol.* 3:321-24, 2001

Gao X., Zacharek A., Grignon DJ., Sakr W., Powell IJ., Porter AT., Honn KV. Localization of potential tumor suppressor loci a < 2Mb region on chromosome 17q in human prostate cancer. *Oncogene.* 11(7): 1241-7, 1995

Grimmler M., Wang Y., Mund T., Cilensek Z., Keidel EM., Waddel MB., Jakel H., Kullmann M., Kriwacki RW., Hengst L. Cdk-inhibitory activity and stability of p27Kip1 are directly regulated by oncogenic tyrosine kinases. *Cell.* 128:269-80, 2007

Gu K., Mes-Masson AM., Gauthier J., Saad F. Analysis of the p16 tumor suppressor gene in early stage prostate cancer. *Molecular carcinogenesis.* 21(3):164-70, 1998

Ha I., Wightman B., Ruvkun G. A bulged lin-4/lin-14 RNA duplex is sufficient for *Caenorhabditis elegans* lin-14 temporal gradient formation. *Genes Dev.* 10:3041-50, 1996

Hake S. MicroRNAs: a role in plant development. *Curr. Biol.* 13:851-52, 2003.

Harfe BD. MicroRNAs in vertebrate development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15:410-15, 2005

Harris KS., Zhang Z., McManus MT., Harfe BD., Sun X. Dicer function is essential for lung epithelium morphogenesis. *PNAS*. 103:2208-13, 2005

He L., Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* 5(7):522-31, 2004

He L., Thomson JM., Hemann MT., Hernando-Monge E., Mu D., Goodson S., Powers S., Cordon-Cardo C., Lowe SW., Hannon GJ., Hammond SM. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*. 435:828-33, 2005

He H., Jazdzewski K., Li W., Liyanarachchi S., Nagy R., Volinia S., Calin GA., Liu CG., Franssila K., Suster S., Kloos RT., Croce CM., de la Chapelle A. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *PNAS*. 102(52):19075-80, 2005

Hill R., Song Y., Cardiff RD., Van Dyke T. Heterogeneous tumor evolution initiated by loss of pRb function in a preclinical prostate cancer model. *Cancer Research*. 65:10243-54, 2005

Iorio MV, Ferracin M., Liu CG., Veronese A., Spizzo R., Sabbioni S., Magri E., Pedriali M., Fabbri M., Campiglio M., Mènard S., Palazzo JP., Rosenberg A., Musini P., Volinia S., Nenci I., Calin GA., Querzoli P., Negrini M., Croce CM. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*. 65(16):7065-70, 2005

Isaccs JT. and Copffey DS. Etiology and disease process of benign prostatic hyperplasia. *Prostate Suppl*. 2:33-50, 1989

Isaccs JT. The biology of hormone refractory prostate cancer. Why does it develop? *Urol Clin North Am*. 26(2):263-73, 1999

Jarrad Df., Bova GS., Ewing CM., Pin SS., Nguyen SH., Baylin SB. Deletional, mutational, and methylation analysis of CDKN2 in primary and metastatic prostate cancer. *Genes Chromosomes & Cancer*. 19(2):90-6, 1997

Jimenez JA., Kao C., Raikwar S., Evangelisti C., Gardner TA. Current status of anti-angiogenesis therapy for prostate cancer. *Urol. Oncology*. 24(3):260-8, 2006

Johnson SM., Grosshans H., Shingara J., Byrom M., Jarvis R., Cheng A., Labourier E., Reinert KL., Brown D., Slack FJ. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 120:635-47, 2005

Kardinal C., Dangers M., Kardinal A., Koch A., Brandt DT., Tamura T., Welte K. Tyrosine phosphorylation modulates binding preference to cyclin-dependent kinases and subcellular localization of p27Kip1 in the acute promyelocytic leukemia cell line NB4. *Blood*. 107(3):1133-40, 2006

Karube Y., Tanaka H., Osada H., Tomida S., Tatematsu Y., Yanagisawa K., Yatabe Y., Takamizawa J., Miyoshi S., Mitsudomi T., Takahashi T. Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci*. 96: 111-15, 2005

- Kawamata N., Morosetti R., Miller CW., Park D., Spirin KS, Nakamaki T., Takeuchi S., Hatta Y., Simpson J., Wilczynski S.** Molecular analysis of the cyclin-dependent kinase gene p27Kip1 in human malignancies. *Cancer Res.* 55(11):2266-9, 1995
- Khvorova A., Reynolds A. and Jayasena SD.** Functional siRNA and miRNAs exhibit strand bias. *Cell.* 115:209-16, 2003
- Kim VN.** Small RNAs: classification, biogenesis, and function. *Mol Cells.* 19(1):1-15, 2005
- Kiyokawa H., Kineman RD., ManovaTodorova KO., Soares VC., Hoffman ES., Ono M., Khanam D., Hayday AC., Frohman LA., Koff A.** Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27Kip1. *Cell.* 85:721-32, 1996
- Kluiver J., poppema S., de Jong D., Blokzijl T., Harms G., Jacobs S., Kroesen BJ., van den Berg A.** BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J Pathol* 207:243-49, 2005
- Konishi N., Shimada K., Ishida E., Nakamura M.** Molecular pathology of prostate cancer. *Pathology International.* 55:531-39, 2005
- Koff A.** How to decrease p27Kip1 levels during tumor development. *Cancer Cell.* 9:75-6, 2006
- Kent OA. and Mendell JT.** A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressor and oncogenes. *Oncogene.* 25:6188-96, 2006
- Krutzfeldt J., Rajewsky N., Braich R., Rajeev KG., Tuschl T., Manoharan M., Stoffel M.** Silencing of microRNAs in vivo with δ antagomirs. *Nature.* 438(7068):685-9, 2005
- Lagos-Quintana., Rauhent R., yalcin A., Meyer J., Lendeckel W., Tuschl T.** Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr. Biol.* 12:735-39, 2002
- le Sage, Nagel R., Egan DA., Schrier M., Mesman E., Mangiola A., Anile C., Maira G., Mercatelli N., Ciafrè SA., Farace MG., Agami R.** Regulation of the p27^{Kip1} tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation. *EMBO J.* 26(15):3699-708, 2007
- Lee EJ., Gusev Y., Jiang J., Nuovo GJ., Lerner MR., Frankel WL., Morgan DL., Postier RG., Brackett DJ., Schmittgen TD.** Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int J Cancer.* 120:1046-54, 2006
- Lee RC., Feinbaum RL and Ambros V.** The *C.elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 75:843-54, 1993
- Lee Y., Ahn C., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., LeeJ., Provost P., Radmark O., Kim S., Kim VN.** The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature.* 425:415-19, 2003
- Lloyd RV., Erickson LA., Jin L., Kulig E., Qian X., Cheville JC., Scheithauer BW.** P27Kip1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. *Am J Pathol.* 154:313-23, 1999

- Lim JT., Mansukhani M., Weinstein IB.** Cyclin-dependent kinase 6 associates with the androgen receptor and enhances its transcriptional activity in prostate cancer cells. *PNAS*. 102:5156-61, 2005
- Lingel A., Simon B., Izaurralde E. and Sattler M.** Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain. *Nature*. 426:465-69, 2003
- Loda M., Cukor B., Tam SW., Lavin P., Fiorentino M., Draetta GF., Jessup JM., Pagano M.** Increased proteasome-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nature Medicine* 231-34, 1997
- Ma L., Teruya-Feldstein J. and Weinberg RA.** Tumor invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*. 449:682-89, 2007
- Macri E., Ioda M.** Role of p27 in prostate carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 17(4):337-44, 1998-1999
- Maddison LA., Sutherland BW., Barrios RJ., Greenberg NM.** Conditional deletion of Rb causes early stage prostate cancer. *Cancer Research*. 64:6018-25, 2004
- Martin MM., Lee EJ., Buckenberger JA., Schmittgen TD., Elton TS.** MicroRNA-155 regulates human angiotensin II type 1 receptor expression in fibroblasts. *J Biol Chem* 281:18277-84, 2006
- McDonnell TJ., Troncoso P., Brisbay SM.** Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Research* 52:6940-44, 1992
- Meltzer PS.** Cancer Genomics: small RNAs with big impact. *Nature*. 435(7043):745-6, 2005
- Meng F., Henson R., Lang M., Wehbe H., Maheshwari S., Mendell JT., Jiang J., Schmittgen TD., Patel T.** Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology*. 130:2113-29, 2006
- Meng F., Henson R., Wehbe-Janek H., Ghoshal K., Jacob ST., Patel T.** MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*. 133:647-58, 2007
- Metzler M., Wilda M., Busch K., Viehmann S. and Borkhardt A.** High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 39:167-9, 2004
- Michael MZ., O'Connor SM., van Holst Pellekaan NG., Young GP. and James RJ.** Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol. Cancer Res.* 12:882-91, 2003
- Millar DS., Ow KK., Paul CL., Russell PJ., Molloy PL., Clark SJ.** Detailed methylation analysis of the glutathione S-transferase, (GSTP1) gene in prostate cancer. *Oncogene*. 18:1313-24, 1999

- Morris MJ. and Scher HI.** Novel strategies and therapeutics for the treatment of prostate carcinoma. *Cancer*. 89(6):1329-48, 2000
- Morris MJ. and Scher HI.** Novel therapies for the treatment of prostate cancer: current clinical trials and development strategies. *Surgical Oncology*. 11:13-23, 2002
- Moss EG., Lee RC., Ambros V.** The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the lin-4 RNA. *Cell*. 88:637-46, 1997
- Murakami Y., Yasuda T., Saigo K., Urashima T., Toyoda H., Okanoue T., Shimotohno K.** Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene*. 25(17):2537-45, 2006
- Nakayama K., Ishida N., Shirane M., Inomata A., Inoue T., Shishido N., Horii I., Loh DY.** Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyper-plasia, retinal displasia, and pituitary tumors. *Cell*. 85:707-20, 1996
- Nelson P., Kiriakidou M., Sharma A., Maniataki E., Mourelatos Z.** The microRNA world: small is mighty. *Trends Biochem. Sci*. 28:534-40, 2003
- Nelson WG., De Marzo AM. and Isaacs WB.** Prostate cancer. *New England Journal of Medicine*. 349:366-81, 2003
- O'Donnel KA., Wentzel EA., Zeller KI., Dang CV., Mendell JT.** C-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*. 435:839-43, 2005
- Pagano M., Tam SW., Theodoras AM., Beer-Romero P., Del Sal G., Chau V., Yew PR., Draetta GF., Rolfe M.** Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science*. 269:682-85, 1995
- Pelengaris S., Khan M. and Evan GI.** Suppression of Myc-induced apoptosis in cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression. *Cell*. 109:321-34, 2002
- Pestell RG., Albanese C., Reutens AT., Segall JE., Lee RJ., Arnold A.** The cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in hormonal regulation of proliferation and differentiation. *Endocrine Rev*. 20:501-34, 1999
- Petersen CP., Bordeleau ME., Pelletier J., Sharp PA.** Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell*. 21(4):533-42, 2006
- Petre-Dravian CE., Cook SL., Burd CJ., Marshall TW., Wetherill YB., Knudsen KE.** Specificity of cyclin D1 for androgen receptor regulation. *Cancer Research*. 63:4903-13, 2003
- Poliseno L., Tuccoli A., Mariani L., Evangelista M., Citti L., Woods K., Mercatanti A., Hammond S., Rainaldi G.** MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood*. 108(9):3068-71, 2006

- Qiao D., Zeeman AM., Deng W., Looijenga LH and Lin H.** Molecular characterization of hiwi, a human member of the piwi gene family whose overexpression is correlated to seminomas. *Oncogene*. 21:3988-99, 2002
- Reinhart BJ., Slack FJ., Basson M., Pasquinelli AE., Bettinger JC., Rougvie AE., Horvitz HR., Ruvkun G.** The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 403:901-6, 2000
- Rodriguez A., Griffiths-Jones S., Ashurst JL., Bradley A.** Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*. 14:1902-1910, 2004
- Saito Y., Liang G., Egger G., Friedman JM., Chuang JC., Coetzee GA., Jones PA.** Specific activation of microRNAs-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell*. 9:435-43, 2006
- Sambrook J., Fritsch EF and Maniatis T.** *Molecular cloning: a laboratory manual*, 1989
- Schwarz DS., Hutvagner G., Du T., Xu Z., Aronin N., Zamore PD.** Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 115(2):199-208, 2003
- Scott GK., Mattie MD., Berger CE., Benz SC and Benz CC.** Rapid alteration of microRNA levels by histone deacetylase inhibition. *Cancer Res*. 66:1277-81, 2006
- Sgambato A., Cittadini A., Faraglia B., Weinstein IB.** Multiple functions of p27^{Kip1} and its alterations in tumor cells. *J Cell Physiol*. 183:18-27, 2000
- Sheaff RJ., Groudine M., Gordon M., Roberts JM., Clurman BE.** Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev*. 11:1464-78, 1997
- Sherr CJ.** Cancer cell cycles. *Science*. 284:1672-77, 1996
- Sherr CJ. and Roberts JM.** CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 13:1501-12, 1999
- Si ML., Zhu S., Wu H., Lu Z., Wu F., Mo YY.** miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*. 26:2799-2803, 2007
- Slingerland J. and Pagano M.** Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol*. 183(1):10-7, 2000
- Song JJ., Liu J., Tolia NH., Schneiderman J., Smith SK., Martienssen RA.** The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nature Struct. Biol*. 10:1026-32, 2003
- Song JJ., Smith SK., Hannon GJ., Joshua-Tor.** Crystal structure of the Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*. 305:1434-1437, 2004
- Sun H, Lesche R., Li DM., Liliental J., Zhang H., Gao J., Gavrilova N., Mueller B., Liu X., Wu H.** PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *PNAS*. 96:6199-204, 1999

Suzuki H., Freije D., Nusskern DR., Interfocal heterogeneity of PTEN/MMAC1 gene alterations in multiple metastatic human prostate cancer tissue. *Cancer Research*. 58:204-9, 1998

Takamizawa J., Konishi H., Yanagisawa K., Tomida S., Osada H., Endoh H., Harano T., Yatabe Y., Nagino M., Nimura Y., Mitsudomi T., Takahashi T. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res*. 64(11):3753-6, 2004

Tam W., Ben-Yehuda D. and Hayward WS. Bic, a novel gene activated by proviral insertions in avian leucosis virus-induced lymphomas, is likely to function through its noncoding RNA. *Mol. Cell. Biol*. 17:1490-502, 1997

Taplin ME. And Balk SP. Androgen receptor: a key molecule in the progression of prostate cancer to hormone independence. *Journal of Cellular Biochemistry*. 91:483-90, 2004

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*. 20:2202-07, 2006

Tsihlias J., Kapusta LR., DeBoer G., Morava-Protzner I., Zbieranowski I., Bhattacharia N., Catzavelos GC., Klotz LH., Slingerland JM. Loss of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is a novel prognostic factor in localized human prostate adenocarcinoma. *Cancer Research*. 58:542-48, 1998

Tsihlias J., Kapusta L., Slingerland J. The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. *Annu Rev Med*. 50:401-23, 1999

Tsvetkov LM., Yeh KH., Lee SJ., Sun H., Zhang H. p27(Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCF(Skp2) complex through phosphorylated Thr187 in p27. *Curr. Biol*. 9:661-64, 1999

Ueda T., Bruchovsky N. and Sadar MD. Activation of the androgen receptor N-terminal domain by interleukin 6 via MAPK and STAT3 signal transduction pathways. *J Biol Chem*. 277:7076-85, 2002

van den Berg A., Kroesen BJ., Kooistra K., de Jong D., Briggs J., blokzijl T., Jacobs S., Kluiver J., Diepstra A., Maggio E., Poppema S. High expression of B-cell receptor inducible gene BIC in all subtypes of Hodgkin lymphoma. *Genes chromosomes Cancer* 37:20-28, 2003

Vivanco I., Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3_kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2:489-501, 2002

Vlach J., Hennecke S., Amati B. Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *EMBO J*. 16:5334-44, 1997

Vlietstra RJ., van Alewijk DC., Hermans KG., van SteenbruggeGJ., Trapman J. Frequent inactivation of PTEN in prostate cancer cell lines and xenografts. *Cancer Research*. 98:2720-23, 1998

Volinia S., Calin GA., Liu CG., Ambs S., Cimmino A., Petrocca F., visone R., Iorio M., Roldo C., Ferracin M., Prueitt RL., Yanaihara N., Lanza G., Scarpa A., Vecchione A., Negrini M., harris CC., Croce CM. A microRNA expression segnature of human solid tumors defines cancer gene targets. *PNAS*. 103:2257-61, 2006

Webber MM., Bello D., Quader S. Immortalized and tumorigenic adult human prostatic epithelial cell lines: characteristics and applications. Part 2. Tumorigenic cell lines. *Prostate*. 30(1):58-64, 1997

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*. 75:855-62, 1993

Woods K., Thomson JM., Hammond SM. Direct regulation of an oncogenic micro-RNA cluster by E2F transcription factors. *J Biol Chem*. 282:2130-34, 2007

Yang RM., Naitoh J., Murphy M., Wang HJ., Phillipson J., deKernion JB., Loda M., Reiter RE. Low p27 expression predicts poor disease-free survival in patients with prostate cancer. *J Urol*. 159:941-45, 1998

Yekta S., Shih IH., Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*. 304:594-6, 2004

Zeng Y. and Cullen BR. Sequence requirements for microRNA processing and function in human cells. *RNA*. 9:175-79, 2003

Zhu S., Si ML., Wu H., Mo YY. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene Tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem*. 282:14328-36, 2007