

Università degli Studi di Ferrara



DOTTORATO DI RICERCA IN ONCOLOGIA MOLECOLARE E FARMACOLOGIA

CICLO XXV

COORDINATORE Prof. Antonio Cuneo

“Studio molecolare e funzionale della famiglia del miR-302 in cellule staminali e tumorali”

Settore Scientifico Disciplinare BIO/11

Dottoranda
Dott.sa Dama Paola

Tutore
Prof. Volinia Stefano

Co-tutore
Dott. Carlo Maria Croce

Anni 2009/2012

I microRNA, chiamati anche miRNA o miR, sono brevi molecole di acido ribonucleico di 19-24 nucleotidi che svolgono un importante ruolo regolativo nell'espressione di proteine cellulari tramite *silenziamento genico post-trascrizionale*. Nonostante la loro identificazione e descrizione sia relativamente recente, ai microRNA sono state attribuite funzioni che coinvolgono pressochè tutti i processi cellulari fisiologici e patologici.

La nostra attività di ricerca ha riguardato lo studio di una famiglia di microRNA, il miR-302. Degli oltre 700 miRNA identificati, il miR-302 sembra essere quello maggiormente espresso in cellule embrionali staminali (-ES-) ed è uno dei microRNA con la più alta specificità di espressione. Abbiamo pertanto svolto uno studio molecolare sui profili di espressione da cellule staminali embrionali umane (hESCs) e da hESC in differenziamento al fine di descrivere la correlazione tra i diversi profili di espressione e lo stato cellulare.

L'ipotesi di CSC (cellule staminali tumorali) fornisce una spiegazione della refrattarietà alla terapia e la capacità latente di alcuni tumori. Nel nostro laboratorio sono stati scoperti una serie di miRNA che svolgono un ruolo critico nel tumore e quindi la nostra ricerca si è concentrata sullo studio dei livelli di espressione nei tessuti normali e le controparti tumorali. Abbiamo poi esaminato l'espressione di mir-302 in campioni di carcinoma duttale in situ e carcinoma invasivo dei campioni del seno. Da indagini di ibridazione in situ, è stato trovato che il MIR-302 è presente nel carcinoma duttale infiltrante, ma non in cellule di tessuto normale. Inoltre, i tumori primari con metastasi linfonodali hanno un eccesso di cellule tumorali che esprimono il mir-302. Sulla base di questa osservazione, si è cercato di comprendere i meccanismi che conducono all'espressione del cluster. Abbiamo osservato che le linee cellulari tumorali di carcinoma mammario trattate in condizioni di ipossia esprimono il miR-302b, mentre la controparte in normossia non la esprimono.

Secondo lo *screening* effettuato su tessuti dei pazienti il miR-302 è legato a metastasi e soprattutto alla scarse aspettative di sopravvivenza dell'individuo. La validazione del target del recettore per gli estrogeni ER-alpha in linee cellulari epiteliali ci ha portato a postulare diverse ipotesi sul ruolo che potrebbe avere l'espressione di miR-302 sulla transizione epitelio-mesenchimale EMT e la sua controparte, MET oltre ad un ruolo nella formazione di metastasi. La scelta di generare un topo knock in grado di esprimere un gene reporter, ZsGreen, sotto controllo del promotore del cluster del miR-302 porterà ad una serie di studi in vivo per i prossimi anni.

MicroRNAs, also called miRNA or miR are short ribonucleic acid molecules of 19-24 nucleotides that play an important regulatory role in the expression of cellular proteins through *post-transcriptional gene silencing*. Despite their identification and description is relatively recent, the microRNAs are assigned tasks that involve almost all physiological and pathological cellular processes.

Our research has focused on the study of a family of microRNAs, miR-302. Among more than 700 miRNA identified, the miR-302 seems to be more expressed in embryonic stem cells (-ES-) and is one of microRNAs with the highest specificity of expression. We performed a molecular study of miR-302 on expression profiles from human embryonic stem cells (hESCs) and hESC in differentiation in order to describe the correlation between the different expression profiles and the cell state.

The hypothesis of CSC (Cancer Stem Cells) provides an explanation for the refractoriness to treatment and the latent ability of certain cancers. Our laboratory have been discovered a number of miRNAs that play a critical role in cancer and therefore our research focus on investigating the expression levels in normal tissues and tumor counterparts. We then examined the expression of mir-302 in samples of *ductal carcinoma in situ* and *invasive carcinoma* of the breast samples. *In situ* hybridization investigation has found that the MIR-302 is present in the infiltrating ductal carcinoma, but not in cells of normal tissue. In addition, primary tumors with lymph node metastasis have an excess of tumor cells expressing the mir-302. Based on this observation, we sought to understand the mechanisms that lead to the expression of the cluster. We observed that tumor cell lines of breast cancer treated in conditions of hypoxia express the miR-302b, while the counterpart in normoxia do not express it.

According to the screening carried out on the tissues of patients the miR-302 bound to metastases and especially to the lower survival of the individual, the target validation of

estrogen receptor ER-alpha in epithelial cell lines has led us to have several assumptions about the role that could have the expression of miR-302 on epithelial mesenchymal transition EMT and its counterpart, MET and the further role in metastasis. The choice of generating a mouse Knock in that express miR-302 marked by a reporter gene, ZsGreen, will lead to a series of in vivo studies for the coming years.

Indice

Introduzione.....
1. I microRNA.....
1.1 La scoperta ed il significato.....	3
1.2 Biogenesi dei MiRNA.....	4
1.3 Meccanismo di azione dei miRNA.....	7
1.4 Ruolo biologico dei miRNA.....	10
1.5 MiRNA e cancro.....	11
1.6 MiRNA ed epigenetica.....	17
1.7 Uso terapeutico dei MiRNA.....	18
2. Il cluster del miR-302s nell'uomo.....
2.1 Struttura ed espressione del cluster.....	19
2.2 Il miR-302 e Nodal.....	25
2.3 Ciclo cellulare e miR-302 in ES cells.....	27
2.4 SCR (Somatic Cell Reprogramming) e miR-302.....	29
2.5 P63 e miR-302.....	30
2.6 miR-302 e cellule tumorali germinali.....	31
3. Cellule staminali.....
3.1 Pathways di staminalità delle cellule staminali embrionali.....	35
3.2 Cellule staminali da liquido amniotico.....	36
3.3 Cellule staminali adulte.....	37
3.4 Genesi del cancro: modelli.....	38
3.5 Cellule staminali tumorali	40
3.6 Origine delle cellule staminali tumorali.....	42
3.7 Divisioni delle cellule staminali.....	45
4. Il cancro della mammella.....
4.1 Classificazione dei sottotipi.....	46
4.2 Il recettore degli estrogeni.....	48
4.2.1 Il recettore degli estrogeni e loro meccanismo di azione.....	49
4.2.2 Il recettore degli estrogeni e ciclo cellulare.....	52

4.3 MicroRNA nel cancro al seno.....	52
4.3.1 miRNA come tumor suppressor.....	53
4.3.2 MiRNA oncogeni.....	60
5. La transizione epitelio mesenchimale.....	63
5.1 Cellule staminali tumorali e transizione epitelio mesenchimale.....	64
5.2 Gata-3 inibisce la transizione epitelio mesenchimale via E-caderina.....	65
5.3 Gata-3 ed il recettore per gli estrogeni ER-alpha.....	66
6. Ipossia.....	68
6.1 Ipossia e biomarcatori delle cellule staminali.....	68
6.2 Ipossia e miR-302.....	70
6.3 Ipossia e transizione epitelio mesenchimale.....	71
6.4 Ipossia e reprogramming.....	73
7. Le mammosfere.....	74
7.1 La cultura di mammosfere prolungata induce la EMT.....	74
7.2 Espressione di Sox2 nelle cellule tumorali di mammella e la sua attivazione nelle CSC.....	75
Scopo della tesi.....	77
Risultati.....	80
1. Analisi dei miRNA espressi in cellule ESC e differenziate	80
1.1 Lo sbilanciamento tra miR-302 e miR-203 definisce le cellule pluripotenti.....	80
1.2. Studio della sequenza promotrice del miR-302 di topo.....	82
2. Espressione del miR302 nei tessuti tumorali	84
3. Espressione del miR-302 in vitro: indagini preliminari.....	85
4. Espressione del miR302b in condizioni di ipossia.....	87
5. Espressione del miR302b nelle mammosfere.....	88
6. Il miR-302 inibisce l'espressione del recettore degli estrogeni ER alpha.....	91
7. Effetti dell'inibizione di ERα sull'espressione genica di GATA-3.....	93

8. Gata 3 inibisce le metastasi del cancro al seno attraverso la transizione inversa della transizione epiteliale-mesenchimale.....	94
9. Aspetti funzionali.....	95
9.1 Saggio di proliferazione.....	95
9.2 Stable cell lines	
9.2.1 Clonaggio del cluster umano in pEGFPc1.....	96
9.2.2. Trasfezione del costrutto ricombinante pEGFP-c1-miR302.....	98
9.2.3 MDA-MB-231 e T47D breast cancer stable cell lines.....	100
9.3 Transgenic mouse.....	100
<i>Discussione.....</i>	<i>106</i>
<i>Conclusione.....</i>	<i>119</i>
<i>Materiali e Metodi.....</i>	<i>121</i>
<i>Ringraziamenti.....</i>	<i>128</i>
<i>Bibliografia.....</i>	

1. I microRNA

1.1 La scoperta ed il significato

Nel 1993 la scoperta di *lin-4*, una molecola ribonucleotidica lunga 22 nt che regola negativamente *lin-14*, non solo identificava il primo microRNA (miRNA), ma metteva in luce anche la rilevanza della sua funzione. (Lee RC, et al. 1993) *Lin-4* è uno dei geni *eterocronici*, geni di “identità temporale” che determinano il destino differenziativo delle cellule in tempi specifici dello sviluppo in *Caenorhabditis elegans* attraverso l’inibizione dell’espressione di *lin-14* e *lin-28*. Mutazioni in tali geni producono alterazioni temporali nei patterns di sviluppo stadio specifici. (Ambros V., et al. 1989) Dopo il clonaggio del gene *lin-4*, fu sorprendente trovare che non c’era una ORF effettiva, ma venivano prodotti due RNA, di cui uno di 61 e l’altro di 22 nt di lunghezza, che adesso sono riconosciuti essere la forma prematura e matura di *lin-4*, rispettivamente. (Lee RC, et al. 1993). La forma matura, il microRNA, è complementare a delle sequenze ripetute nella regione in 3’ non tradotta (UTR) dell’ mRNA di *lin-14*. Alla fine del primo stadio larvale *lin-4* si lega in 3’UTR di *lin-14* e ne impedisce la traduzione. (Chalfie M., et al. 1981) Un meccanismo simile è stato più tardi descritto per *let-7* e la sua regolazione di un set di geni che include *lin-14*, *lin-28*, *lin-41*, *lin-42* e *daf-12* in *C.elegans*. (Olsen PH, et al.1999) I microRNA, chiamati anche miRNA o miR, sono corte molecole di acido ribonucleico costituite da 19-24 nucleotidi. Svolgono un importante ruolo regolatorio nell’espressione di molte proteine cellulari tramite *silenzamento genico post-trascrizionale*. I miRNA sono codificati da geni endogeni, per lo più localizzati in introni di geni codificanti per proteine, o sono trascritti in RNA policistronici, cioè che portano l’informazione per più geni (il trascritto di mRNA corrispondente è in grado di tradurre per più catene polipeptidiche diverse, in sequenza). (Reinhart BJ, et al. 2000)

Le scoperte relative ai microRNA manifestano due aspetti unici della loro specifica funzionalità:

1. una fine regolazione del *timing* di un preciso evento cellulare
2. l’inibizione sincrona di una cascata di geni che sono funzionalmente interdipendenti, quindi che operano da interruttore molecolare efficiente.

Queste funzioni aggirano la necessità di regolare i geni singolarmente, quindi sono potenzialmente più veloci ed hanno una efficienza energetica maggiore, che consiste in quello che *Beyer et al.* chiamavano regolazione trascrizionale “on demand”. (*Beyer et al.* 2004) C'è da aggiungere che la co-regolazione post-trascrizionale di geni funzionalmente affini è validamente supportata da due osservazioni:

1. la correlazione positiva tra gli mRNA e l'abbondanza proteica di geni funzionalmente affini, ma non quelli di cellule intere o di compartimenti separati di cellule.
2. mRNA di geni affini funzionalmente spesso possiedono una velocità di decadimento simile.

I miRNA quindi posseggono la versatilità e la specificità funzionale necessaria per spiegare queste peculiarità cellulari. Negli ultimi anni sono stati identificati in vertebrati, moscerini, piante e anche in virus oltre 5,000 membri di questa nuova classe di piccoli RNA non codificanti regolatori. I geni codificanti per proteine dei più evoluti organismi eucariotici, non sono in un numero tale da spiegare la complessità di tali organismi. E' stato stimato che circa il 96-98% dell'output trascrizionale del genoma umano è rappresentato dagli RNA che non codificano per proteine (ncRNAs). I ncRNAs contribuiscono a regolare le funzioni cellulari, per cui i miRNA che appartengono a questa classe molecolare, potrebbero anch'essi spiegare quello che viene definito il *Paradosso del Genoma*.

1.2 Biogenesi dei miRNA

I miRNA vengono trascritti a livello nucleare da una *RNA polimerasi II*, (*Lee Y, et al.* 2004) che genera un trascritto primario a singola elica (pri-miRNA) che, dopo appaiamento intracatenario forma una struttura secondaria a forcina. (*Filippov V et al.* 2000.)

Tale struttura è riconosciuta da Drosha, un'RNasi III appartenente alla superfamiglia delle endoribonucleasi specifiche per l'RNA double-stranded (ds) che taglia la doppia elica lasciando sporgere due nucleotidi alla estremità 3' nel sito di taglio. Drosha fa parte di un complesso proteico di 650-kDa circa conosciuto come Microprocessor. (*Gregory RI et al.* 2004). Nell'uomo Drosha interagisce con il cofattore DGCR8 che conferisce specificità al processo. Il prodotto del Microprocessor è il precursore del

miRNA (pre-miRNA) di circa 70-90 nucleotidi e viene trasportato nel citoplasma dalla proteina recettoriale di esportazione nucleare Exportin-5 (Exp5) e il suo cofattore Ran-Guanosine Triphosphate (Ran-GTP). (*Bohnsack MT et al. 2004.*)

Il complesso Exp5/Ran-GTP ha un'alta affinità per il pre-miRNAs, proteggendoli dal momento in cui sono generati nel nucleo fino a quando sono pronti per il prossimo taglio nel citoplasma, dove il GTP viene idrolizzato a Guanosina Difosfato (GDP). Avvenuto ciò il complesso Exp5/Ran-GDP rilascia il suo carico.

I due nucleotidi sporgenti lasciati da Drosha sono determinanti per il successivo processamento, che avviene ad opera di un secondo enzima appartenente alla famiglia delle RNasi III: Dicer. E' un multi dominio proteico di 200-kDa caratterizzato da un dominio RNA elicasi/ATPasi (DUF283) un dominio PAZ per il legame all'estremità 3' terminale dell'RNA, 2 domini catalitici dell'RNasi III (RIIIa and RIIIb) e un dominio di legame con il dsRNA (dsRBD). dsRBD e RIIIDs sono certamente coinvolti nel legame e taglio dell'RNA doppio strato. Dato che il pre-miRNA generato da Drosha presenta già 2 nucleotidi protrudenti ad un'estremità 3', riconosciuta da PAZ, Dicer taglia la regione doppio strato approssimativamente 20 nucleotidi più avanti. (*Zhang H et al. 2004*) Il prodotto è un miRNA duplex lungo 21-25 nucleotidi, con estremità 5' fosfato e due nucleotidi sporgenti ad entrambe le estremità 3'.

Come DGCR8 per Drosha, proteine con dominio di legame dell'RNA doppio strato, come TRBP (*Transactivating Response RNA-Binding Protein*) e la proteina attivatrice della protein chinasi (PACT) negli umani, si legano a Dicer e contribuiscono con la sua funzione. TRBP e PACT facilitano il taglio del pre-miRNA e TRBP stabilizza Dicer. (*Chendrimada TP et al. 2005.*) (*Lee Y et al. 2006.*)

Queste proteine partecipano alla selezione dello *strand* del miRNA maturo e/o al passaggio dei miRNA al complesso che induce il silenziamento dell'RNA (RISC) o miRgonaute, che media la degradazione o l'inibizione traslazionale dell' mRNA bersaglio.

In realtà solo una delle catene viene incorporata (in particolare quella la cui estremità 5' si apre più facilmente), mentre quella esclusa viene rapidamente degradata. Il microRNA si lega al RISC interagendo con un membro della famiglia proteica Argonauta (AGO) in esso incluso: AGO ha massa molecolare di circa 100 kDa e contiene due domini, PAZ (piwiargonaute-zwille) e PIWI. PIWI è implicato in interazioni con Dicer, mentre PAZ è un RNA binding domain (RBD) che lega il miR riconoscendone specificamente la parte terminale, compresi i due nucleotidi sporgenti

dalla doppia elica. AGO si esprime sotto forma di diversi omologhi nelle varie specie di organismi eucarioti e i suoi diversi schemi di espressione influenzano l'esito del silenziamento genico. Inoltre sono state purificate altre proteine nel RISC oltre ad AGO di cui non si è certi se svolgano ruoli essenziali o accessori: perciò probabilmente il complesso del RISC media diversi meccanismi di inibizione post-trascrizionale, manifestandosi in varie conformazioni.

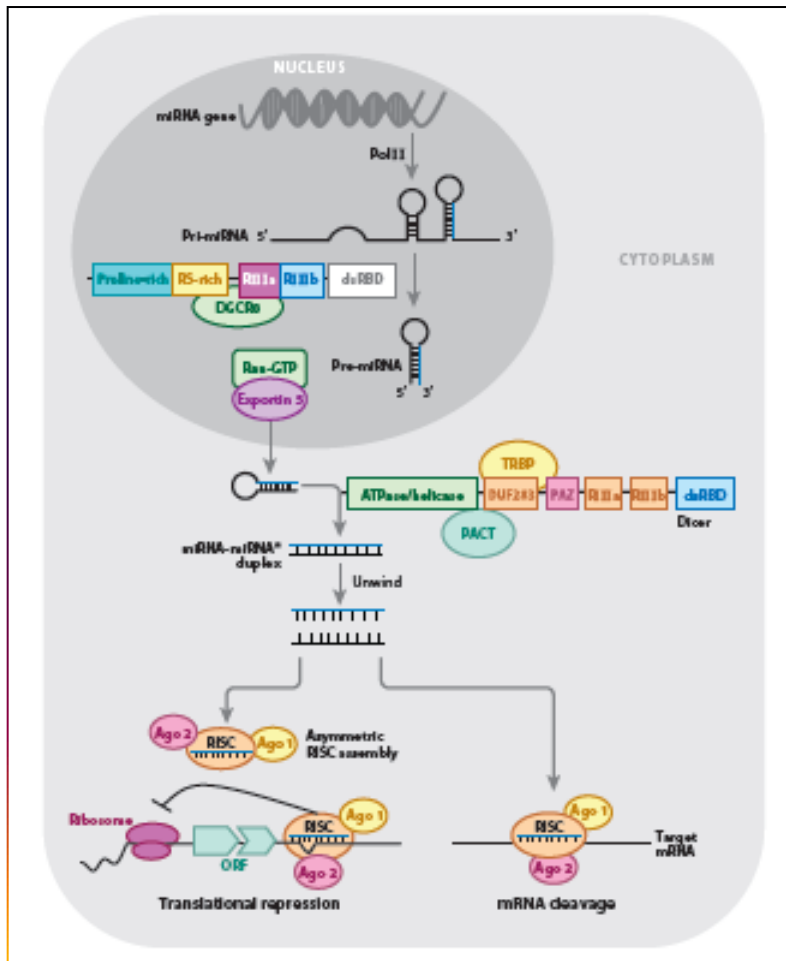


Figura 1.

Biogenesi dei microRNA.

La produzione dei microRNA (miRNA) dal pri-miRNA è un processo complicato operato da diversi gruppi di enzimi e proteine associate del nucleo e del citoplasma. Il pri-miRNA, localizzato nel nucleo, viene convertito in pre-miRNA mediante il taglio da parte dell'enzima Dicer. Il pre-miRNA, presenta un fosfato in 5' e l'estremità 3' idrossiterminale. Il pre-miRNA prodotto viene esportato nel citoplasma dal complesso Exportin 5 (Exp5)/Ran-guanosina trifosfato (Ran-GTP). Exp5 forma un eterotrimerico nucleare con Ran-GTP e il pre-miRNA. Questa interazione, che è dipendente dalla struttura dell'RNA ma indipendente dalla sua sequenza, stabilizza il pre-miRNA nucleare e promuove l'esportazione nel citoplasma.

Qui il pre-miRNA viene processato dall'RNasi III citoplasmatica Dicer a miRNA, un duplex lungo 18-22 nucleotidi circa. Normalmente, un filamento di questo duplex viene degradato, mentre l'altro diventa il miRNA maturo. Dal miRNA-miRNA* duplex, solo il singolo miRNA entra nel complesso effetore della proteina, formato dal complesso che induce il silenziamento del miRNA (RISC) e miRgonauta. La perfetta o quasi complementarietà tra il miRNA e la regione in 3' UTR induce RISC a tagliare l'mRNA bersaglio. [Acronimi: DGCR8, DiGeorge syndrome critical region gene 8 protein; dsRBD, double-stranded RNA-Binding Domain; ORF, Open Reading Frame; PACT, Protein Activator of Protein kinase R; Pol II, RNA polymerase II; TRBP, Transactivating Response RNA-Binding Protein. (M. Garofalo e C. M. Croce. 2010)]

1.3 Meccanismo di azione dei miRNA

I miRNA sono i principali regolatori negativi della traduzione dell'mRNA ed esercitano i loro effetti attraverso vari meccanismi. Il primo passaggio prevede che il pre-miRNA sia assemblato in un grande complesso proteico conosciuto come RISC o miRISC (*miRNA RNA-inducing silencing complex*). Alcune delle proteine conosciute che formano il complesso RISC includono *Dicer*, una endonucleasi RNA-specifica, che è coinvolta nel processo di trasformazione del pre-miRNA nella rispettiva forma matura; la proteina *Argonaute* (Ago), che ha quattro isoforme, di cui solo *Ago2*, conosciuta anche come *Slicer*, ha la capacità di aderire all' mRNA; *PW182* una proteina P-body; *TRBP*, *human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein*, che recluta *Ago2* al complesso; *FMRP1*, *fragile X mental retardation protein*; ed altre proteine la cui funzione non è stata ancora esaminata completamente. Guidato da una parziale complementarità di sequenza tra il *seed* del miRNA ed il suo target, il complesso lega i siti target dei miRNA, principalmente entro la regione 3'UTR del gene.

Sono stati identificate due categorie di siti bersaglio dei miRNA. I bersagli nella prima categoria, sono i siti "5' dominanti", le paia di basi dell'estremità 5' terminale del miRNA. Sebbene c'è una continuità della qualità del 3' con questa classe è utile distinguere due sottotipi: siti "canonici", che si appaiano bene sia all'estremità 5' che a quella 3', e i siti "seed" sites, che richiedono il supporto di un minimo o nullo appaiamento in 3'. I bersagli nella seconda categoria, i siti "3' compensatori", hanno un fragile legame di basi al 5' e dipendono da un forte appaiamento compensatorio all'estremità 3' dei miRNA. Tutti questi tipi di siti sono utilizzati dai miRNA per la regolazione dei bersagli, ma la sola complementarità con la regione "seed" (nucleotidi 2-7) è essenziale per il riconoscimento del sito bersaglio. (*Julius Brenneck et al. 2005*)

Comunemente si pensa che i MicroRNA hanno due funzioni di regolazione post-trascrizionale, la degradazione dell'mRNA e l'inibizione della traduzione dell'mRNA (*Pillai 2005 Engels e Hutvagner 2006; Valencia-Sanchez et al 2006.. Filipowicz et al 2008*). Anche se una parziale complementarità di sequenza tra i miRNA e dei suoi targets (per lo più in animali) sono associati alla repressione traduzionale, vi sono prove concrete di una diminuzione dei livelli di mRNA anche con un accoppiamento di basi imperfetto (*Bagga et al 2005;. Jing et al 2005;. Lim et al . 2005; Giraldez et al 2006.. Sood et al 2006*), suggerendo un ruolo dei miRNA nella destabilizzazione dell'mRNA e non in un rapporto esclusivo tra degradazione e la repressione. E 'stato

suggerito che i miRNA possono degradare mRNA di circa 200bp (*Krek et al 2005*), con gradi di repressione diversi delle proteine (*Baek et al 2008,.. Selbach et al 2008*), anche se il numero di target previsti può variare in migliaia . Una delle principali ragioni per questi falsi positivi risiede proprio nella complementari imperfetta tra i miRNA e dei suoi target.

I siti bersaglio dei miRNA negli animali sono noti giacere nella 3'-UTR del gene. Il miRNA scoperto, lin-4 in *Caenorhabditis elegans*, è stato trovato regolare i tempi specifici di sviluppo legandosi ai siti in 3'-UTR di lin-14 (*Wightman et al. 1993*). Dopo la scoperta dei miRNA in altri animali, un primo studio computazionale ha identificato alcuni siti nella parte terminale in 5' dei miRNA come complementari a sequenze nella 3'-UTR (*Pillai 2005*). Nel frattempo, molti miRNA predetti grazie a sequenze altamente conservate tra le specie, sono state in gran parte confermate (*Suh et al. 2004*). Questa elevata conservazione in combinazione con perfette sequenze complementari 8-mer di miRNA ha portato allo studio delle sequenze motivo 8-mer UTR altamente conservate nel genoma, che ha trovato significativi siti bersaglio dei miRNA solo nella 3'-UTR attraverso l'estremità 5' del miRNA (*Xie et al. 2005*). Il significato di questo 5'-end del miRNA e i siti nella 3'-UTR è stato confermato da uno studio di proteomica che ha mostrato la maggiore capacità di inibizione della proteina per siti nelle 3'-UTR rispetto a quelli nella regione codificante (*Baek et al. 2008*). Il limite degli studi precedenti sta nel fatto che lo studio delle sequenze motivo dell'intero Genoma si è concentrato solo sui motivi altamente conservati, escludendo quelli meno conservati o umano-specifici (*Xie et al. 2005*). Questo approccio ha il limite intrinseco di non identificare le sequenze specie-specifiche, incluse le sequenze dei miRNA non conservati. Uno studio successivo cercando regioni di mRNA di interazione ha limitato la sua ricerca alla estremità 5 del miRNA (*Baek et al. 2008*), mentre studi precedenti hanno suggerito un ruolo per il 3' end di un miRNA sia nella integrazione della complementarietà del seed sia nella compensazione imperfetta (*Doench e Sharp 2004; Kiriakidou et al 2004;. Kloosterman et al 2004;.. Grimson et al 2007*). La maggior parte esperimenti di verifica dei miRNA di riferimento è stata utilizzata solo la 3'-UTR dei siti di interazione in quanto molti studi hanno mostrato gli effetti dei miRNA solo con porzioni di 3'-UTR. Anche esperimenti di validazione di lin-4 e lin-14 non ha utilizzato l'intero mRNA, ma piuttosto il 3'-UTR unitamente alla regione codificante (*Wightman et al. 1993*). D'altra parte, alcuni esperimenti hanno indicato possibili siti bersaglio nella 5'-UTR (*Jopling et al 2005;.. Lytle et al 2007;. Orom et al*

2008). *Inhan Lee et al.* 2009 sulla base sia dell'energia di ibridazione sia sulla complementarità delle sequenze, hanno identificato molti motivi endogeni umani all'interno della 5'-UTR specifici per i 3'-end dei miRNA. Piuttosto che suggerire possibili interazioni dei miRNA con altre regioni del mRNA, hanno riportato le interazioni combinatorie tra un singolo miRNA ed entrambe le regioni di estremità di un mRNA, basandosi sulla constatazione che i microRNA contengono molti siti di interazione significativi con gli mRNA nei motif 5'-UTR e 3'-UTR attraverso le loro sequenze 3'-5'-end e, rispettivamente.

Sono tre i meccanismi molecolari alla base della riduzione dell'espressione genica operata dei microRNA: 1) repressione della traduzione; 2) degradazione diretta dell'mRNA e 3) degradazione indiretta dell'mRNA. Studi compiuti sul nematode *Caenorhabditis Elegans* mutanti o transgenici hanno dimostrato che miRNA indirizzati verso specifici geni, riducevano la sintesi proteica senza abbassare i livelli di mRNA e che il blocco della traduzione avveniva durante le fasi di allungamento o di terminazione, in quanto sia l'mRNA bersaglio che i miRNA sono stati trovati in associazione con poliribosomi.

Un secondo meccanismo utilizzato dai miRNA è l'inibizione dell'inizio della traduzione, che richiede sia il cap (*Humphreys DT et al.* 2005; *Pillai RS et al.* 2005; *Thermann R et al.* 2007) che la coda di polyA. Questo è dimostrato da un modello in cui i fattori di inizio eucariotici 4G (eIF4G), una subunità che si lega al cap in 5', lega la proteina PABP (poly A-binding protein) promuove la circolarizzazione della molecola dell'mRNA una struttura traduzionalmente superiore alla forma lineare. Ago2 e RISC contengono dei cap-binding domain che competono con eIF4E inibendo il legame con il complesso di inizio della traduzione m7GpppG cap, (*Kiriakidou M et al.* 2007) Ago2 inoltre ha anche la capacità di competere con eIF4E per la sua interazione con eIF4G e distruggere il complesso di inizio della traduzione.(*Iwasaki S. et al.* 2009)

Un meccanismo più elaborato è stato descritto nel caso in cui i miRNA possono indurre la deadenilazione dell'mRNA (*Behm-Ansmant I et al.*2006; *Wakiyama M et al.*2007; *Wu L. et al.* 2006)

Diversi studi recenti hanno rivelato che, sotto specifiche condizioni, i miRNA possono anche comportare un'attivazione traduzionale degli mRNA bersaglio. (*M. Garofalo e C. M. Croce.* 2010)

I microRNA nelle piante adottano in maniera prevalente il meccanismo di degradazione dell'mRNA bersaglio. Tali miR presentano omologia perfetta o quasi con le proprie

regioni bersaglio che non sono localizzate esclusivamente nella regione 3'UTR, ma lungo tutto l'mRNA.

1.4 Ruolo biologico dei miRNA

Il fatto che questi piccoli RNA siano presenti in molte e diverse specie, regolando finemente i delicati processi di sviluppo e differenziamento cellulare, fa pensare all'importante ruolo che possano aver svolto durante l'evoluzione delle specie eucariotiche. Le specifiche funzioni biologiche dei miRNA e la regolazione della loro espressione, sono ancora da chiarire ma sono sempre più numerosi gli studi. Di certo si sa che sono implicati nei processi di sviluppo e differenziamento cellulare non solo in *C. Elegans*, ma anche nei mammiferi, nell'uomo e nel topo la loro espressione è tessuto specifica. Nel topo, per esempio il miR-181 è implicato nel differenziamento ematopoietico, e promuove il differenziamento in linfociti B sia in vivo che in vitro ed il miR-143 è coinvolto nel differenziamento degli adipociti. E' interessante notare che i miRNA sono stati individuati solo in organismi multicellulari, mentre sono assenti in organismi unicellulari, e potrebbero perciò essere essenziali per il differenziamento dei vari tipi di tessuto e per il mantenimento dello stato differenziativo.

Il pattern di espressione dei microRNA è regolato durante lo sviluppo ed è generalmente tessuto specifico. Alcuni miRNA sono molto abbondanti, più di 10000 copie per cellula (*Lim et al. 2003*), mentre altri sono scarsamente rivelabili con tecniche di ibridazione all'RNA totale (*Ambros V. 2004*). Vi sono miRNA particolarmente abbondanti in un tessuto, come ad esempio il miR-1 nel tessuto muscolare scheletrico (*Sempere LF et al. 2004*), che possono tuttavia essere ritrovati anche in altri tessuti, mentre esistono microRNA organo-specifici come il miR-122 nel fegato ed il miR-124 nel cervello che non sono presenti in altri tessuti. L'elevata conservazione di questi microRNA organo-specifici tra le varie specie animali suggerisce che essi potrebbero giocare un ruolo ben preciso e filogeneticamente conservato nella costituzione e/o nel mantenimento di un tipo cellulare o tissutale di un determinato organo. Vi sono infatti evidenze sperimentali che dimostrano l'importanza dei miRNA nello sviluppo precoce e tardivo dei vertebrati (*Wienholds et al. 2005*). Negli ultimi anni sta quindi diventando sempre più rilevante l'importanza dei microRNA nel controllo dello sviluppo, della fisiologia e della patologia animale.

A questo riguardo, l'individuazione e la caratterizzazione dei bersagli e dei pathway molecolari regolati dai miRNA rappresenta uno step fondamentale per far luce sull'ampio spettro di azioni biologiche esercitate dai microRNA. A fianco dell'analisi genetica, è quindi necessario eseguire un'accurata analisi computazionale ed una successiva analisi funzionale in vitro. L'analisi in silico prevede l'utilizzo di algoritmi bioinformatici quali TargetScan (<http://genes.mit.edu/targetscan/>), PicTar (<http://pictar.bio.nyu.edu/>) e miRanda (<http://cbio.mskcc.org/cgi-bin/mirnaviewer/mirnaviewer.pl>) che vengono utilizzati per la predizione dei target biologici dei microRNA. Tali algoritmi si basano su programmi di allineamento che consentono di individuare sequenze conservate di 7-8 nucleotidi con un'elevata complementarietà alle 'seed sequence' dei miRNA ed un'alta stabilità termodinamica, con punteggi che variano da 0 a 100, dove 0 rappresenta nessuna complementarietà e 100 perfetta complementarietà. L'analisi in silico dovrà essere successivamente affiancata da un'analisi funzionale in vitro, al fine di dimostrare l'effettiva regolazione dei geni bersaglio da parte dei miRNA, e da studi con geni reporter al fine di dimostrare l'interazione diretta tra il miRNA ed il sito complementare presente nel 3'UTR dell'mRNA bersaglio.

Ad oggi il registro dei miRNA (www.mirbase.org) che conta oltre 720 miRNA umani, viene costantemente aggiornato e può essere interrogato per ottenere informazioni inerenti strettamente alla struttura del microRNA di interesse. Il numero di miRNA identificati è crescente e si pensa che possa superare il migliaio.

1.5 MicroRNA e cancro

Evidenze sperimentali hanno dimostrato come alcuni microRNA siano differenzialmente espressi in tessuti sani e in tessuti tumorali: i microRNA possono essere sia sotto-espressi (come avviene nella maggior parte delle neoplasie), che sovra-espressi. Inoltre, circa la metà dei miRNA conosciuti sono localizzati all'interno di siti fragili (fragile sites) e in regioni minime di perdita di eterozigosi (LOH), regioni di amplificazione e comuni punti di rottura associati con il cancro.

Diversi studi hanno mostrato che alcuni miRNAs funzionano come oncogeni in molte forme di cancro (*Tabella 1*) (M. Garofalo e C.M. Croce. 2010).

Il miR-155 è uno dei primi descritti. (Metzler M et al. 2004). Questo miRNA è seguito dai nucleotidi 241–262 di BIC (cluster di integrazione delle cellule B), che è lungo 1421 paia di basi in totale e si trova sul cromosoma 21. Il miR-155 è altamente espresso

nel linfoma di Burkitt pediatrico, (*Metzler M et al. 2004*), nella malattia di Hodgkin, (*Kluiver J. et al. 2005*), nel linfoma primario non-Hodgkin (*Calin GA et al. 2005*), nella Leucemia Linfocitica Cronica (CLL), nella Leucemia Myelogenous Acuta (AML) (*Garzon R, Volinia S et al. 2008.*), nel cancro ai polmoni (*Volinia S et al. 2006*), nel cancro al pancreas (*Greither T et al. 2010*) e nel cancro alla seno. Il miR-155 regola negativamente Ship e c/EBP β , iniziando una catena di eventi che porta all'accumulo di grandi pre-cellule B e alla leucemia linfoblastica acuta.

Un altro esempio è dato dal miR-221&222, la cui espressione è altamente regolata in diversi tumori solidi, incluso il cancro alla tiroide (*Pallante P et al. 2006*), l'epatocarcinoma (*Fornari F et al. 2008*) e le cellule del melanoma (*Felicetti F et al. 2008*). Un'elevata espressione del miR-221&222 è stata collegata con la proliferazione (*Sage C et al. 2007*), l'apoptosi (*Garofalo M et al. 2008*), e la migrazione (*Garofalo M et al. 2009*) di diverse linee cellulari di cancro. E' stato recentemente riportato che l'oncogene recettore dei fattori di crescita degli epatociti (MET), attraverso l'attivazione trascrizionale di c-Jun, aumenta l'espressione del miR-221&222, il quale, a sua volta, bersagliando PTEN e TIMP3, conferisce resistenza ai ligandi inducenti fattori di necrosi tumorale correlati all'apoptosi (TRAIL) che provocano la morte cellulare, aumentando così la tumorigenicità delle cellule cancerose del polmone e del fegato. *Pineau e Co.* hanno confermato questi dati mediante un profilo di espressione di miRNA in 104 campioni di epatocarcinoma cellulare (HCC), 90 con fegato cirrosi, 21 con fegato normale, e 35 di linee cellulari di HCC (*Pineau P, Volinia S, et al. 2009*). Il miR-221&222 risulta essere il miRNA più sovraespresso nei campioni tumorali ed aumentare la crescita delle cellule in vitro legando p27Kip1 che è l'inibitore della kinasi ciclina dipendente (CDK) e definendo la progressione della malattia dal fegato normale ai tumori con fegato cirrotico. La crescita tumorale riscontrata nei campioni veniva efficientemente inibita mediante uno specifico antimir-221&222. Infine è stato identificato che il trascritto che induce il danno al DNA 4 (DDIT4), un modulatore della pathway di mTor, viene legato dal miR-221. Alcuni miRNA agiscono invece come onco-soppressori.

Table 1 OncomiRs

miRNA gene	Localization	miRNA target	Dysregulation in cancer	Reference(s)
<i>miR-155</i>	21q21.3	Shp c/EBP β Pu.1 Cut1 Pcalm	Upregulated in pediatric Burkitt's lymphoma, Hodgkin's disease, non-Hodgkin's lymphoma, and CLL, as well as breast, lung, colon, and pancreatic cancer	30–35, 55, 89
<i>miR-21</i>	17q23.1	PTEN PDCD4	Overexpressed in breast, lung, prostate, gastric, cervical, head and neck, and colorectal cancer, as well as glioblastoma	36–42, 55, 56, 89, 93, 95, 97
<i>miR-221&222</i>	Xp11.3	PTEN TIMP3 p27 p57 Bim DDIT4 FOXO3A	Upregulated in hepatocarcinoma, CLL, melanoma, and glioblastoma, as well as lung, breast, thyroid, and prostate cancer	43–50, 94
<i>miR-106b-93-25 cluster</i>	7q22.1	P21/Cip1 Bim	Overexpressed in gastric, prostate, colon, and pancreatic cancer, as well as neuroblastoma and multiple myeloma	51
<i>miR-17-92 cluster</i>	13q31.3	p63 E2F1 P21 Bim	Upregulated in lung and colon cancer, as well as lymphoma, medulloblastoma, and multiple myeloma	52–54, 57, 58, 99

Tabella 1.

I microRNA più attivamente regolati in umani nella leucemia linfocitica cronica (CLL).

(Michela Garofalo and Carlo M. Croce. 2010)

I miR-15 and -16 sono stati i primi a stabilire la connessione tra miRNA e cancro (*Calin GA et al. 2002*) (*Tabella 2*): sono trascritti come un cluster (miR-15a–miR-16-1) che si trova nella regione cromosomica 13q14. Una delezione o una mutazione della regione 13q14 si riscontra con alta frequenza in CLL, linfoma e diversi tumori solidi (*Bandi N et al. 2009*). La loro espressione è inversamente correlata con l'espressione di BCL2 in CLL (*Cimmino A et al. 2005*). La funzione di oncosoppressori di miR-15a/16-1 è stata riscontrata anche in vivo. In topi immunocompromessi, si è visto che l'induzione dell'espressione del miR-15a/16-1 causa la soppressione della tumorigenicità delle cellule leucemiche MEG-01 che hanno perso l'espressione endogena del miR-15a/16-1. Recentemente è stato visto che il cluster del miR-15a–miR-16-1 si lega non solo a BCL2 ma anche a CCND1 (*Bonci D et al. 2008*) e a WNT3A, che promuove caratteristiche della tumorigenicità della prostata, incluse la sopravvivenza, la proliferazione e l'invasione cellulare. Insieme, questi dati suggeriscono che i geni del miR-15a/16-1 sono naturali interattori antisense di BCL2 e probabilmente di altri oncogeni; possono essere quindi utilizzati come soppressori della crescita dei tumori in applicazioni terapeutiche per una varietà di tumori. Si sta attualmente sperimentando il potenziale terapeutico dell'espressione di oligonucleotidi

antisense leganti BCL2 nel cancro alla prostata (*Tolcher AW et al. 2005*). La reintroduzione del miR-15a–miR-16 potrebbe essere teoricamente più efficace per la simultanea inibizione di BCL2, CCND1, WNT3A e altri possibili bersagli, come MCL-1, coinvolto nella proliferazione delle cellule del cancro e nella resistenza all'apoptosi. Esiste una correlazione inversa tra let-7 e RAS nei tumori al polmone (*Johnson SM et al. 2005*) (*Tabella 2*). Nel 2005, *Johnson e co.* hanno riportato che la perdita dei membri della famiglia del let-7 è riscontrata nella sovra-espressione costitutiva di RAS, un oncogene che contribuisce con la patogenesi di diversi tipi di tumori umani (*Johnson et al., 2005*). Inoltre è stato visto (*Sampson VB et al. 2007*) che la sovra-espressione di let-7 causa una diminuzione dell'mRNA e della proteina di Myc in cellule del linfoma, suggerendo che la disregolazione di questo miRNA partecipa nella genesi e nel mantenimento del fenotipo patologico nelle cellule del linfoma di Burkitt e in altre forme di cancro. E' stato visto che let-7 si lega anche al gruppo ad alta mobilità AT-hook 2 (HMGA2), un gene che è disregolato in diversi tumori umani, incluso il liposarcoma (*Lee YS et al. 2007*). La famiglia del miRNA-34 comprende 3 membri: 1) miRNA-34a, che si genera da una più grande unità trascrizionale localizzata sul cromosoma 1p36; 2) miR-34b e 3) miR-34c, che sono generati mediante il processamento di un trascritto bicistronico dal cromosoma 11q23 (*Tabella 2*). Per identificare i componenti del pathways della soppressione dei tumori, sono stati comparati i profili di espressione dei miRNA di cellule wild-tipe di cellule p53-deficienti (*He L, He X, Lim LP, de Stanchina et al. 2007*) ed è stato scoperto che l'espressione dei miR-34a–c riflettono lo stato di p53; sono stati identificati diversi bersagli del miR-34 come la ciclina E2 (CCNE2), CDK4, e MET. Il silenziamento di questi bersagli del miR-34 mediante l'uso di small interfering RNAs (siRNAs) porta ad un arresto della fase G1. Al contrario, la distribuzione etopica del miR-34 causa un decremento nei livelli di produzione del gene del retinoblastoma fosforilato (Rb), con conseguente minore attività dei complessi CDK4 e CCNE2. BCL2 e MYCN sono stati identificati essere bersagli del miR-34a ed essere mediatori dell'effetto fenotipico di soppressione dei tumori nel neuroblastoma (*Cole KA et al. 2008*). Altri studi hanno riportato che Notch1, Notch2, e CDK6 sono deregolati dal miR-34a nelle cellule del glioma (*Li Y, Guessous F et al. 2009*) e i membri della famiglia del miR-34 sono stati identificati anche come promettenti marker prognostici nel Carcinoma Polmonare a Non Piccole Cellule (NSCLC). Il miR-29, altamente espresso nelle cellule epiteliali che costituiscono l'albero biliare intra-epatico (colangiociti) e deregolato nelle cellule

maligne del colangiocarcinoma; è un regolatore endogeno dell'espressione della proteina Mcl-1 e quindi dell'apoptosi. E' stato dimostrato che i membri della famiglia del miR-29 (miR-29a, miR-29b, e miR-29c) eliminano direttamente p85 alpha (la subunità regolatoria della phosphoinositide 3-kinase) e CDC42 (una GTPase della famiglia di Rho), i quali regolano negativamente p53, e possono indurre l'apoptosi in maniera p53-dipendente (*Park SY, Lee JH et al. 2009*) (Tabella 2). Il miR-122, specifico per il fegato, (*Tsai WC, Hsu PW et al. 2009*) è significativamente deregolato nel carcinoma epatico con metastasi intraepatiche. Il ripristino del miR-122 nelle cellule metastatiche riduce significativamente la migrazione, l'invasione e l'ancoraggio-crescita indipendente in vitro, mentre in vivo riduce la tumorigenesi, l'angiogenesi e la metastasi intraepatica in un modello di cancro ortotopico del fegato. Inoltre, è stato visto che ADAM17 (una disintegrina e metalloproteasi) è coinvolta nelle metastasi come un bersaglio del miR-122.

Table 2 Tumor suppressor miRNAs

miRNA gene	Localization	miRNA target	Dysregulation in cancer	Reference(s)
<i>miR-15/16</i>	21q21.3	Bcl-2 CCND1 WNT3A	Downregulated in CLL, DLBCL, multiple myeloma, pituitary adenoma, prostate cancer, and pancreatic cancer	27, 59-63
<i>let-7</i>	17q23.1	Ras Myc HMGA2	Downmodulated in liposarcoma and CLL, as well as gastric, lung, prostate, breast, ovarian, and colon tumors	64-66, 76
<i>miR-34a/b/c</i>	Xp11.3	CCNE2 MET Bcl2 MycN Notch1/Notch2 CDK4/6	Downregulated in pancreatic cancer and Burkitt's lymphoma without Myc translocation Hypermethylated in colon tumors	67-70
<i>miR-29</i>	7q22.1	Mcl-1 CDC42	Downmodulated in CLL and cholangiocarcinoma, as well as colon, breast, and lung cancer	71, 72, 74
<i>miR-122</i>	13q31.3	ADAM17	Downregulated in HCC	73

Tabella 2.

I miRNA più deregolati nel cancro umano. (Michela Garofalo and Carlo M. Croce. 2010)

I microRNA possono intervenire nel fenomeno dell'apoptosi: un esempio è costituito dal gene *bantam* di *Drosophila*, che codifica per un microRNA che a sua volta svolge funzioni antiapoptotiche (regolando negativamente il gene pro-apoptotico *hid*) e stimola la proliferazione cellulare. Data l'imperfezione dell'appaiamento tra il microRNA e i propri geni bersaglio, la predizione di questi ultimi si rivela complessa, in quanto è dovuta ad altri fattori, oltre che alla complementarità tra le basi, anche se è noto che l'appaiamento dei nucleotidi che vanno dal secondo all'ottavo (in direzione 5', 3') del microRNA con la regione genica bersaglio ha una grande importanza. La creazione di

algoritmi quali *miRanda*, *TargetScan* e *PicTar* ha permesso la predizione di numerosi geni bersaglio, che oltre alla perfetta omologia di appaiamento tra i nucleotidi 2-8 del microRNA e la regione bersaglio, considerano l'eventuale omologia (anche imperfetta) con la restante sequenza del microRNA e anche la conservazione filogenetica della sequenza bersaglio

I tre algoritmi hanno consentito di predire centinaia di bersagli e grazie ad essi si è potuto ipotizzare che ciascun microRNA influenzi l'espressione di circa un centinaio di geni diversi, anche se non è ancora possibile stabilire con certezza la veridicità delle loro predizioni perché solo pochi dei bersagli predetti (come RAS per let-7, ed altri) sono stati convalidati con altri metodi.

I microRNA non sono implicati solo nello sviluppo di tumori primari, ma anche nella progressione e nella fase metastatica della malattia. Infatti, diversi dati mostrano come i microRNA siano implicati nella regolazione di processi biologici relativi all'acquisizione di potenziale metastatico, come adesione, migrazione e invasione e angiogenesi. Per esempio, il miR-10b è deregolato in tutti i carcinomi alla mammella di pazienti senza metastasi, ma, sorprendentemente, il 50% dei pazienti con metastasi presenta elevati livelli di miR-10b nei loro tumori primari. Il microRNA miR-10-b attiva indirettamente il gene pro-metastatico RHOC attraverso la soppressione di HOXD10; invece tre microRNA: microRNA miR-335 , microRNA miR-206 e microRNA miR-126 sono stati identificati come soppressori di metastasi sempre nel tumore della mammella (*Ma L, Teruya-Feldstein J et 2007*)

E' stato recentemente osservato che tumori primari e metastasi dallo stesso tessuto, mostrano un pattern di espressione di miRNA simile (*Rosenfeld N et al 2008*); i microRNA possono controllare la progressione del tumore anche a questo livello, promuovendo o inibendo la proliferazione delle cellule endoteliali. I miR-221 and miR-222 reprimono le proprietà proliferative ed angiogeniche di c-Kit nelle cellule endoteliali, (*Poliseno L et al. 2006*) mentre la riduzione ipossica di miR-16, miR-20a e miR-20b, che bersagliano direttamente i fattori di crescita endoteliali vascolari, va a favore del processo angiogenico (*Hua Z, Lv Q, Ye W, et al. 2006*). I livelli dei fattori di crescita vascolari possono essere indirettamente incrementati dal miR-27b, mediante riduzione della proteina ZBTB10 e la conseguente attivazione del fattore di trascrizione Sp (*Mertens-Talcott SU et al. 2007*) e dal miR-126, mediante repressione della proteina Spred-1 e della subunità regolatoria 2 della fosfoinositolo 3-chinasi (*Fish JE, Santoro MM et al. 2008*)

L'angiogenesi può essere promossa anche dal miR-210, attivato tramite ipossia e repressore diretto del ligando endoteliale eparina A3 (*Pulkkinen K et al.2008.*) e dal cluster del miR-17-92 cluster, che sostiene le proprietà angiogeniche di MYC mediante la repressione dei fattori di crescita del tessuto connettivo e della trombospodina 1, una glicoproteina adesiva antiangiogenica, legata anche dal miR-27b e let-7f.(*Kuehbacher A et al. 2007*)

1.6 MiRNA ed epigenetica

La deregolazione dell'espressione dei microRNA nel cancro può anche essere dovuta a difetti nel macchinario della biogenesi dei microRNA. Questo è supportato dai cambi dei livelli dei microRNA conseguenti all'alterata attività di Drosha o Dicer nei diversi tipi di tumori e dalle modificazioni epigenetiche, come l'alterazione della metilazione del DNA. Un'estensiva analisi delle sequenze genomiche dei geni dei miRNA ha mostrato che circa la metà di loro è associata con le isole CpG, suggerendo che loro potrebbero essere soggette a questi meccanismo di regolazione. Diversi dati hanno infatti provato che uno stato di metilazione alterata potrebbe essere responsabile della deregolata espressione dei miRNA nel cancro, come il silenziamento di microRNA soppressori di tumori: trattando le cellule del cancro alla vescica T24 e fibroblasti umani con 5-Aza-2-deoxycytidine, inibitore di DNMT, è stata osservata una forte regolazione positiva del miR-127, microRNA caratterizzato da un promotore dell'isola CpG, capace di legarsi al proto-oncogene *BCL-6*, e silenziato in diverse cellule di cancro (*Saito Y, Liang G, Egger G, et al. 2006.*). Con lo stesso approccio è stato dimostrato che il miR-9-1 è ipermetilato e conseguentemente deregolato nel cancro alla mammella (*Lehmann U, Hasemeier B et al. 2008.*), come per il miR-34b e il miR-34c nel cancro al colon (*Toyota M, Suzuki H et al.2008*). La metilazione non è l'unico meccanismo epigenetico che può avere effetto sull'espressione dei microRNA; per esempio nelle cellule SKBR3 di carcinoma alla mammella, l'inibizione dell'istone deacetilasi è seguita da un'estensiva e rapida alterazione dei livelli dei microRNA (*Iorio et al. 2009*).

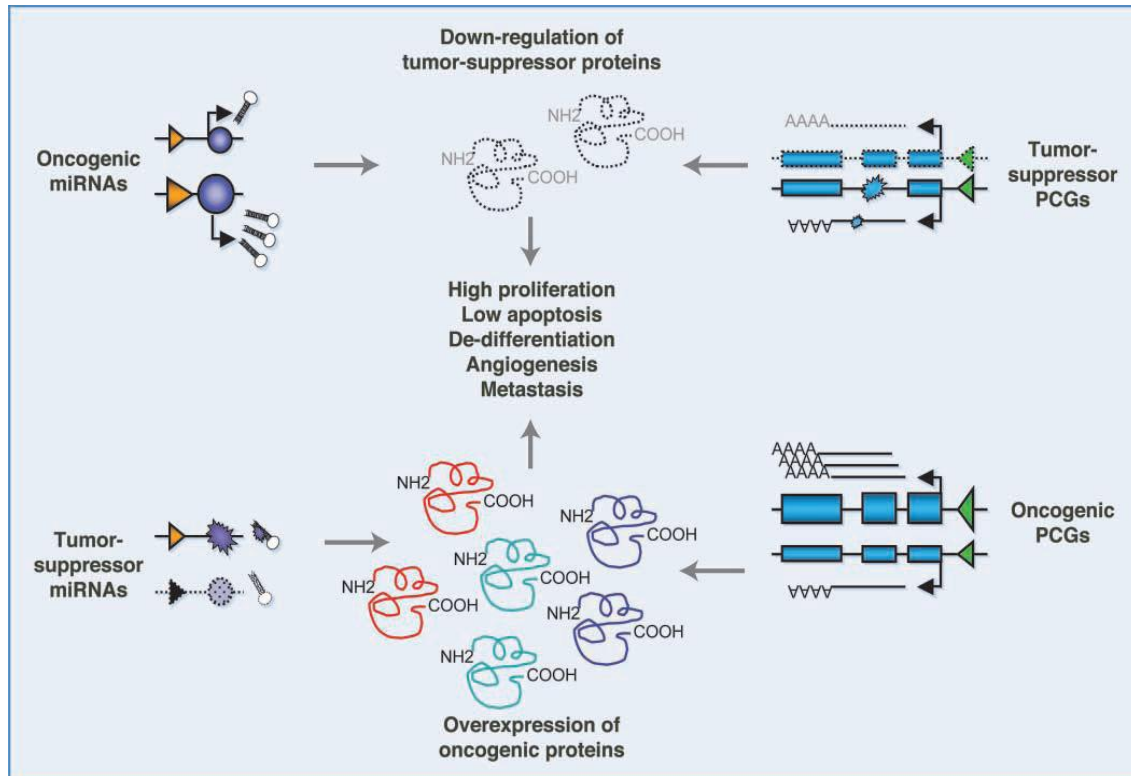


Figura 3.

Genesi dei tumori umani, miRNA oncogeni e miRNA soppressori.

Eventi attivatori o inattivatori di microRNA e la cooperazione con geni codificanti proteine (PCGs) coinvolti in genesi di tumori umani. Le anomalie riscontrate e che influenzano l'attività dei microRNA sono le stesse descritte per i bersagli PCGs, inclusi riarrangiamenti cromosomici, amplificazioni genomiche o delezioni, e mutazioni. L'inattivazione di tumor-suppressors PCGs e l'attivazione di miRNA oncogenici hanno la stessa conseguenza molecolare: riduzione del livello di proteine bloccanti la proliferazione e l'attivazione dell'apoptosi. In contrasto, l'attivazione di PCGs oncogenici e l'inattivazione di tumor-suppressor miRNA sono seguiti da accumulazione di proteine che stimolano la proliferazione e diminuiscono l'apoptosi.

1.7 Uso terapeutico dei miRNA

Considerando l'importanza dei microRNA nello sviluppo, progressione e trattamento del cancro, si sta cominciando a sfruttare il potenziale utilizzo di una terapia basata sui microRNA, modulando la loro espressione reintroducendo i microRNA persi nel cancro, o inibendo microRNA oncogenici, utilizzando oligonucleotidi anti-microRNA. Per esempio, la trasfezione dei miR-15a/16-1 induce l'apoptosi nelle cellule leucemiche MEG01 e inibisce la crescita del tumore in vivo, mentre l'inibizione del miR-21 con un oligonucleotide antisense genera una risposta pro-apoptotica e antiproliferativa in vitro in differenti modelli cellulari e riduce lo sviluppo del tumore e il potenziale metastatico in vivo (Si ML, Zhu S, Wu H, et al. 2007). Inoltre, i microRNA sono coinvolti in

specifici networks, come l'apoptosi, la proliferazione, o la pathways guidata dai recettori, che potrebbero influenzare la risposta a determinate terapie o a chemioterapie: l'inibizione del miR-21 e del miR-200b aumenta la sensibilità alla gemcitabina nei colangiociti, probabilmente mediante modulazione di *CLOCK*, *PTEN*, e *PTPN12*.(*Meng F et al:2006*)

Una nuova ricerca pubblicata su Nature Medicine indica che farmaci mirati, come gefitinib potrebbero trattare in modo più efficace il cancro ai polmoni non a piccole cellule, se combinati con agenti che determinano il blocco di microRNA. Lo studio mostra che la sovraespressione di due geni, MET e EGFR, provoca la deregolamentazione dei sei microRNA, e che tale deregolamentazione porta alla resistenza gefitinib. I risultati confermano lo sviluppo di agenti per ripristinare i livelli di questi microRNA, inoltre offrono anche una nuova strategia per il trattamento del tumore non a piccole cellule del polmone (NSCLC), che è responsabile di circa l'85 per cento dei 221 mila dei casi di cancro e 157.000 decessi che si verificano ogni anno negli Stati Uniti. Infine, suggerisce che misurare i livelli di espressione di alcuni microRNA, quelli controllati dal gene MET , potrebbe prevedere quali casi di cancro al polmone possono essere resistenti a gefitinib.

EGFR (che sta per "recettore del fattore di crescita epidermico") è spesso sovra-espresso nel tumore non a piccole cellule del polmone (NSCLC), e questo porta ad una proliferazione cellulare incontrollata. Gefitinib inibisce selettivamente l'attivazione di EGFR e attiva le cellule tumorali ad autodistruggersi per apoptosi. Cellule NSCLC inevitabilmente possono però sviluppare resistenza al farmaco. Questo ulteriore studio conferma l'assoluta importanza dei miRNA nel cancro ed il motivo per cui le attuali ricerche volgono il loro interesse nell'uso terapeutico dei miRNA.

2. Il cluster del miR-302-367 nell'uomo

Numerose evidenze sperimentali hanno suggerito un ruolo importante dei miRNA nella biologia delle cellule staminali embrionali, ESC. Il cluster del *miR-302-367* sembra esclusivamente espresso ad alti livelli nelle ESCs, ma non pare sia presente né nelle cellule staminali somatiche, né nelle cellule adulte/embrionali differenziate. La struttura del gene del *miR-302-367* nell'uomo è stata identificata, caratterizzata e funzionalmente validata nelle cellule staminali umane. L'attività del promotore dipende dalla ontogenesi e gerarchia cellulare. Il promotore del *miR-302-367* è trascrizionalmente regolato da fattori trascrizionali specifici delle ESC quali *Oct3/4*, *Sox2* e *Nanog* e la sua attività è ristretta al compartimento staminale. Funzionalmente questo cluster regola il ciclo cellulare nelle ESCs promuovendo il self-renewal e la pluripotenza, quindi rappresentando un master regulator nel mantenimento della staminalità nelle hESC.

2.1 Struttura ed espressione del cluster

La sequenza genomica codificante per il *miR-302* è localizzata nel locus 4q25 del cromosoma 4 umano (<http://genome.ucsc.edu/>): il gene codificante per il cluster del *miR-302-367* è di tipo Pol II, pertanto codifica per un prodotto trascrizionale a cui verrà aggiunto il cap in 5' e la coda di poly-A in 3'. Il gene codificante il *miR302-367* contiene 2 esoni e 3 introni, il trascritto con splicing alternativo, può o non può includere l'esone 2. Il cluster del miRNA è localizzato nel primo introne e nessuna dei due tipi di mRNA maturo ottenuto mediante diverso splicing sembra codificare per qualche proteina. Il cluster del *miR302-367* umano è policistronico, cioè è organizzato in modo che tutti gli 8 diversi miRNA vengano prima espressi in un singolo mRNA che verrà in seguito processato e maturato da Drosha/DGCR8 e Dicer in modo da ottenere i singoli miRNA: *miR302a*, *miR302a**, *miR302b*, *miR302b**, *miR302c*, *miR302c**, *miR302d*, e *miR367*. È stato trovato il punto di partenza del trascritto primario del *miR-302* in una timina localizzata 153 bp prima della sequenza codificante il *miR-302b**, che è il primo miRNA del cluster (*Figura 4*). (Alicia Barroso-delJesus et al. 2008). I maggiori membri della famiglia del *miR302* (*302a*, *302b*, *302c*, e *302d*) condividono una sequenza altamente omologa, differente solo nell'esanucleotide in 3'. Le sequenze dei motif in 3' trovate per *miR302a*, *miR302b*, *miR302c* e *miR302d* sono rispettivamente UGG, UGA, UAGUAG, CAGUGG, e GAGUGU. E' stato visto che

l'esanucleotide in 3' di alcuni miRNA può agire come elemento di localizzazione nucleare (Alicia Barroso-delJesus et al. 2008).

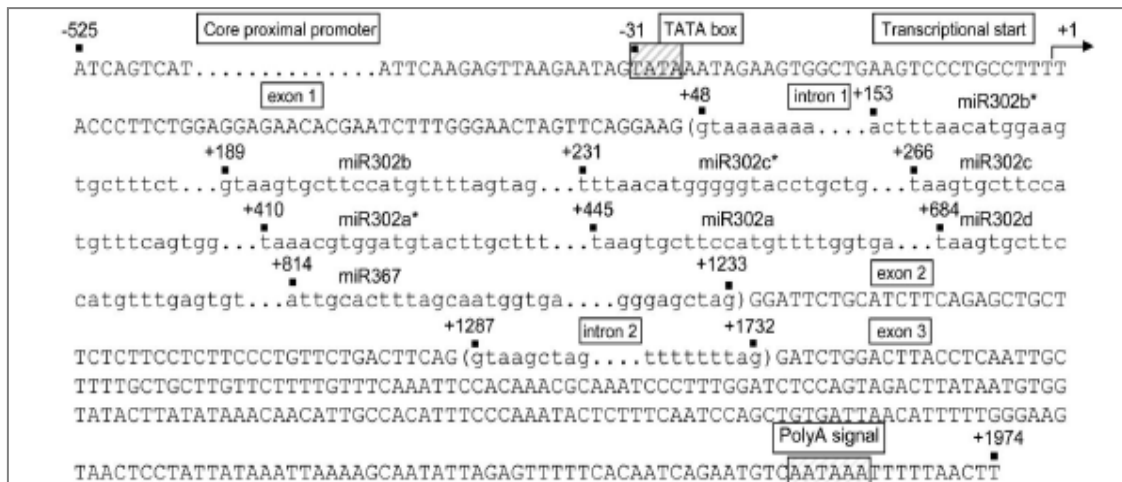


Figura 4. Unità trascrizionale del gene del miR302-367.

Struttura del gene e componenti genomici dell'unità trascrizionale del miR302-367 umano. Il primo nucleotide ad essere trascritto è numerato come + 1 (inizio della trascrizione). Il cluster del miR302-367 è localizzato con il primo introne. (Alicia Barroso-delJesus et al. 2008)

Tramite Northern Blot è stato determinato il rapporto dei livelli di espressione dei *miRNA302a*, *miR302b*, *miR302c* e *miR302d* tra nucleo e citoplasma nelle hECCs (*Figura 5*). Le membrane sono state ibridate con le sonde U6 snRNA e lysine-tRNA rispettivamente, come marker nucleare e citoplasmatico al fine di verificare il frazionamento subcellulare. I quattro membri della famiglia del *miR302* mostrano una predominante localizzazione citoplasmatica (range, 57%-70%) con nessuna differenza rilevante fra di essi (*Figura 5*). Quindi l'esanucleotide in 3' non promuove la localizzazione nucleare per nessuno di questi membri della famiglia del *miR302*.

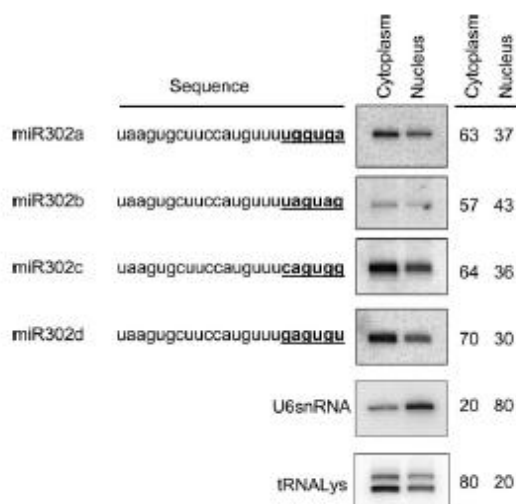


Figura 5.

Distribuzione intracellulare dei membri della famiglia del miR-302.

L'analisi Northern blot è stata utilizzata per confrontare la quantità di *miR-302a*, *miR-302b*, *miR-302c* e *miR302d* presente nel citoplasma e nel nucleo delle hECCs.

(Alicia Barroso-delJesus et al. 2008)

Per identificare l'importanza funzionale del *motif* del gene del *miR302-367* sono state allineate le sequenze di distinte specie euteriane: *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Bos taurus* e *Canis familiaris* (*Figura 6*).

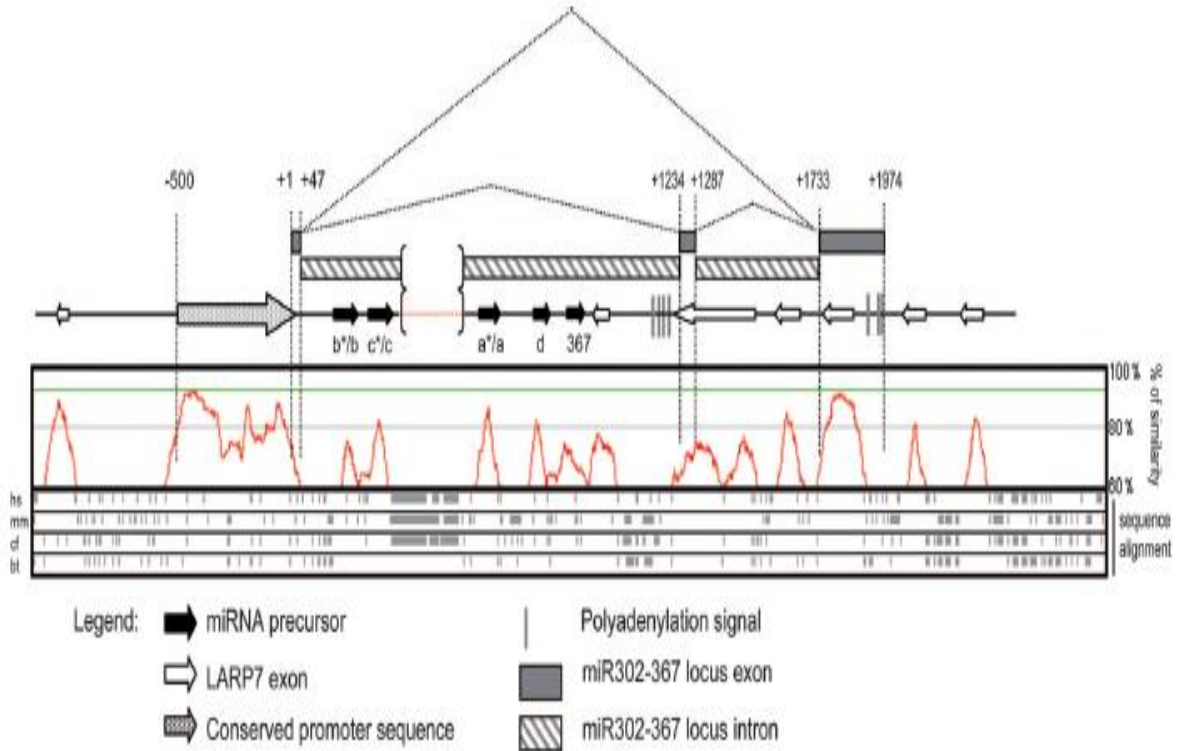


Figura 6 *Rappresentazione della struttura del locus del miR302-367.*

La figura è una rappresentazione schematica del locus del *miR302-367* umano. Le frecce nere rappresentano il precursore del *miRNA*. I rettangoli grigi rappresentano gli esoni del *miR302-369*. I rettangoli segnati dalle linee indicano gli introni. Il segnale di poliadenilazione è rappresentato con una linea grigia verticale. La sequenza conservata del promotore è posta prima dell'inizio della trascrizione ed è rappresentata da una freccia grigia. Le frecce bianche rappresentano gli esoni di *LARP7*. la parte più bassa della figura mostra un profilo di similarità di sequenza, (rappresentato in rosso) ottenuta dall'allineamento multiplo degli omologhi di *Homo sapiens* (*hs*), *Mus musculus* (*mm*), *Canis familiaris* (*cf*), and *Bos taurus* (*bt*). (Alicia Barroso-delJesus et al. 2008)

Il gene del *miR302-367* è stato trovato sovrapporsi (to overlap) con il gene per la proteina Larelated 7 (*LARP7*), codificato dal DNA genomico del filamento opposto. Una regione altamente conservata, non correlata con la sequenza codificante per *LARP7*, è localizzata a monte dell'inizio della trascrizione del gene del *miR302-367*. Si è inizialmente pensato che questa regione conservata potesse essere il promotore del gene del *miR302-367*. Per verificare questa ipotesi è stato analizzata l'attività trascrizionale della regione conservata di 525-bp (*PROM_525*) e di quella di un

frammento più lungo, di 974-bp che include una sequenza a monte (PROM_974) in differenti tipi cellulari comprendenti differenti stati ontogenici (embrionale contro adulti) e con diversi potenziali di sviluppo (cellule staminali contro cellule non-staminali) (Alicia Barroso-delJesus et al. 2008).

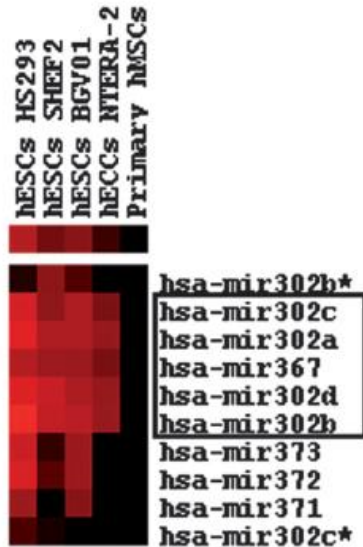


Figura 7.

Profilo di espressione del miR-302 in cellule embrionali.

Il livello di espressione di un pannello di 170 miRNAs è stato determinato tramite una RT-PCR quantitativa.

I dati sono stati normalizzati sui livelli di mRNA di GAPDH e il livello di espressione è relativo ad un mix di campioni di tessuti adulti di riferimento. Gli spot completamente rossi indicano un aumento della regolazione di almeno 20 volte del miRNA del campione studiato rispetto al riferimento. Gli spot neri indicano che non vi è differenza nei livelli di espressione dei miRNA nei campioni rispetto al riferimento.

(Alicia Barroso-delJesus et al. 2008)

In generale, il profilo di espressione del promotore del *miR-302-367* mostra una robusta attività trascrizionale nella fase embrionale (hESCs, hECCs, e mESCs) che però diminuisce fino a diventar nulla durante il differenziamento (hMSCs e linee cellulari adulte) . E' stata osservata un'attività trascrizionale simile tra la regione PROM_525 e PROM_974. Questi dati confermano che la regione, altamente conservata di 525-bp può rappresentare il core del promotore che regola l'espressione basale del gene del *miR302-367* e che la sequenza addizionale presente nel costrutto PROM_974 può contenere elementi di enhancing. Il promotore risulta attivo durante lo sviluppo embrionale (hESCs, mESCs, e hECCs), ma viene inattivato nella fase tardiva dello sviluppo (hMSCs e linee di cellule trasformate). Dal punto di vista gerarchico, l'attività del promotore viene deregolata durante la differenziazione delle cellule staminali, a dimostrazione che è limitata alle ESC. Questi dati indicano che l'attività del promotore del *miR302-367* dipende dalla fase gerarchica e ontologica delle cellule. È stato eseguito un profilo di espressione su un pannello di miRNA in differenti hESCs, hMSCs e hECCs (*Figura 7*). I risultati del profilo di espressione e i dati relativi all'attività trascrizionale del promotore del *miR-302* indicano che vi è un' espressione specifica del cluster del *miR-302-367* per la fase embrionale.

Per determinare se i fattori di trascrizione Oct4 e Sox2 attivano direttamente il miR-302, è stato clonato un frammento di 1kb contenente la regione del promotore del miRNA nel vettore pGL3. Il costrutto è stato poi introdotto nelle hESCs in cui è stata diminuita la quantità delle proteine Oct4 e Sox2 usando dei siRNAs e in hESC di controllo. Nelle cellule con minore quantità di Oct4 si osserva il 65% della riduzione dell'attività della luciferasi rispetto al controllo. Questi dati confermano che l'espressione del miR-302 è dipendente da Oct4/Sox2 nelle hESCs e suggerisce che Oct4 e Sox2 funzionano come attivatori trascrizionali. (*Alicia Barroso-delJesus et al. 2008*)

2.2 Il miR-302 e NODAL

Le cellule staminali embrionali umane (hESCs) sono derivati degli epiblasti che fanno parte della Massa Cellulare Interna (ICM) di una blastocisti o di embrioni prima fase di morula. Un'ibridazione in situ su embrioni di topo ha rivelato che il miR-302 è abbondantemente espresso nella regione embrionale/epiblasto dell'embrione durante la gastrulazione ed è escluso dalla struttura extraembrionale (*Alessandro Rosa, et al. 2009*). Il miR-302-367 inibisce Lefty, che è l'effettore intermediario negativo del pathway di TGF β / Nodal / Activin. Il pathway di Nodal gioca un ruolo cruciale nella specificazione della linea germinale. Studi condotti sull'embrione di topo e su hESCs hanno suggerito un ruolo di Nodal nella prevenzione delle cellule epiblastiche pluripotenti dalla differenziazione verso cellule neuronali anteriori in modo da permettere la specificazione del mesendoderma. Nodal è espresso nella parte sinistra dell'organismo nelle prime fasi dello sviluppo ed è importante per la formazione dell'asimmetria destra-sinistra. Il knockout di Nodal nel topo causa l'assenza della striscia primitiva e la mancata formazione del mesoderma, con conseguente arresto dello sviluppo dopo la gastrulazione. Nell'uomo, miR-302 si lega a entrambi i ligandi Lefty, ma non a Nodal (*Figura 9*).

Human Lefty1	1403-actgcactatattcta agcactt acatgtggagataact-1440
Human Lefty2	1336-tccatcaccatccta agcactt acgtgagtaaataat-1373
Human Nodal	No "seed" complementary sequence

Figura 9.

miR-302 bersaglia Lefty negli umani

Sequenza del bersaglio putativo del miR-302 targets negli human. I numeri indicano la posizione della sequenza in accordo con il Centro Nazionale per l'informazione Biotecnologica. La sequenza complementare alla regione seed è indicata in rosso. (Alessandro Rosa et al. 2009)

Per chiarire il ruolo funzionale del miR-302 nelle hESC sono stati effettuati esperimenti di perdita di funzione con l'oligonucleotide LNA (Locked Nucleic Acid) antisenso per il miR-302 (*Constance Ciaudo et al. 2009.*). Si osserva una forte diminuzione dei livelli di espressione sia dei markers specifici per il mesoderma, come Brachyury e FoxF1, che per i markers dell'endoderma come Mixl1 e Sox17a. Invece i marker neuroectotermi precoci mostrano una risposta contraria al knockdown del miR-302; l'espressione dei markers di pluripotenza Oct4 e Nanog rimane invariata. Questi risultati indicano che il miR-302 è richiesto per una corretta differenziazione del mesoderma e dell'endoderma nell'uomo. Il miR-302 induce specificamente l'espressione di entrambi i markers mesodermici Brachyury e FoxF1 e dei markers endodermici Mixl1 and Sox17a.

Al contrario, la spontanea differenziazione verso il neuroectoderma viene ostacolata, come si può vedere sperimentalmente, dalla forte riduzione dell'espressione di Pax6, Sox1, e NeuroD1 (*Figura 10*). Infine, per verificare direttamente se l'espressione del miR-302 comporta un decremento di Lefty, sono stati differenziati i corpi embrionali (Ebs) in presenza della proteina ricombinante Lefty (recLefty)..

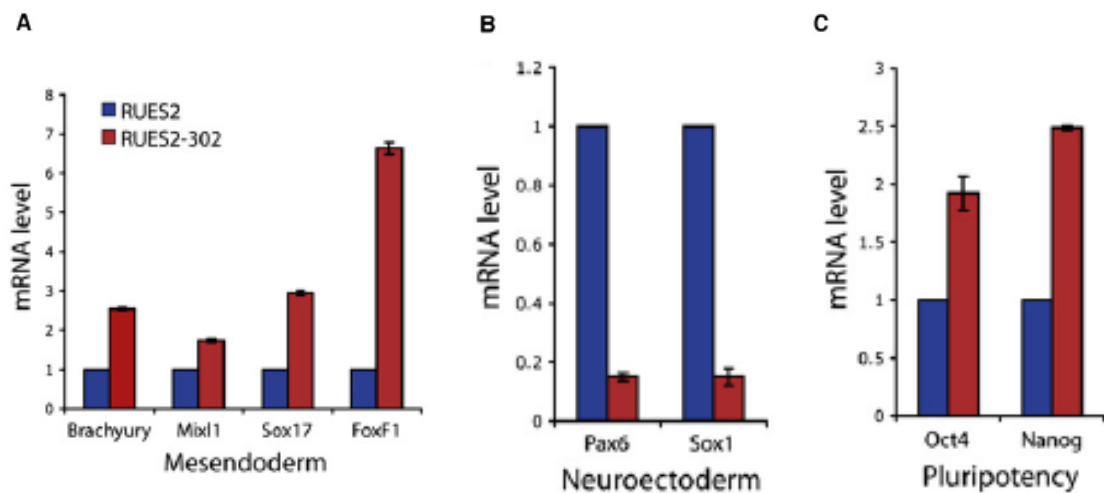


Figura 10.

Overespressione del miR-302 in cellule staminali embrionali umane.

Analisi con Real-time qPCR dell'espressione dei markers indicati, nelle cellule RUES2 (barra blu) e RUES2-302 (barra rossa) differenziate in EB per 11 giorni. (Alessandro Rosa et al. 2009.)

Dato che il miR-302 può legarsi a Lefty solo a livello dell' mRNA, il ligando esogeno recLefty reverte l'effetto della repressione del miRNA sul gene endogeno lefty

compensando il decremento nella loro traslazione. In presenza di recLefty, rispetto al controllo, si osserva una diminuzione dei livelli dei geni del mesendoderma e l'induzione dei geni del neuroectoderma. Quindi il miR-302 aumenta attività di Nodal riducendo l'attività del suo inibitore e incrementando l'effetto soglia di Nodal. Inoltre questo aumento dell'attività di Nodal sostiene l'espressione dei marker della pluripotenza, come Oct4, nel differenziamento delle hESCs.

2.3 Ciclo cellulare e miR-302 in ES cells

Non appena le cellule si differenziano, progressivamente la popolazione cellulare passa da una corta fase G1 ad una lunga fase G1 del ciclo cellulare e questo cambio è mediato dall'attenuazione dell'espressione del miR-302.

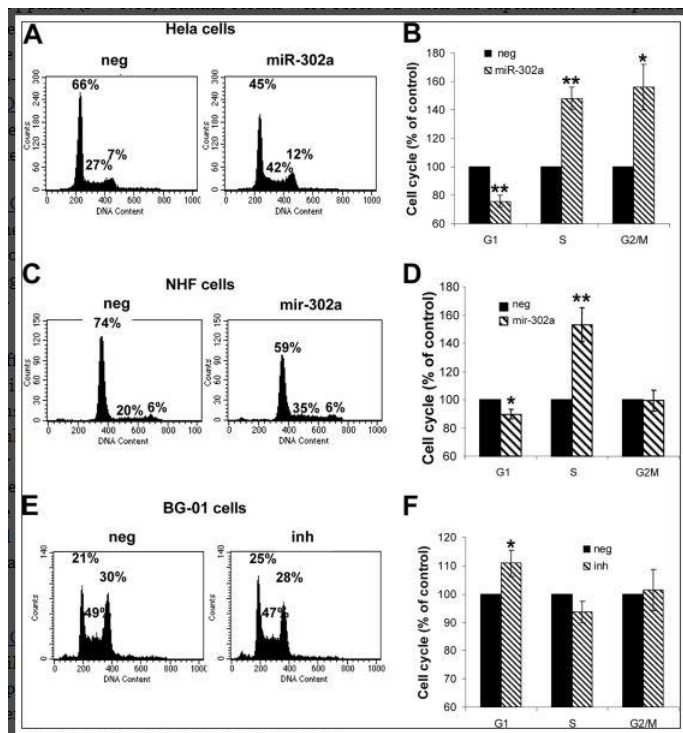


Figura 11. miR-302 miRNAs target cell cycle regulators and promote an ESC-like cell cycle

L'espressione del cluster del miRNA miR-302 è associato con una fase G1 breve. Cellule HeLa sono state trasfettate con pre-miR-302a o il controllo pre-miR negativo (neg). Analisi del ciclo cellulare è stata eseguita mediante FACS. La percentuale di cellule in G1, S e G2 / M sono rappresentate nel grafico. Qui sono illustrati una tipica analisi FACS plot (A) e un grafico che

rappresenta la media \pm SEM dei risultati di tre esperimenti indipendenti (B). (C e D) NHFs sono state trasfettate con pre-miR-302a o negativo di controllo pre-miR. Qui sono illustrati una tipica analisi FACS trama (C) e un grafico che rappresenta la media \pm SEM dei risultati di quattro esperimenti indipendenti (D). (E ed F) BG-01 cellule cresciute su piastre Matrigel sono state trasfettate con 200 pmol miR-302a,-b,-c di ognuno, e d-inibitori (ab) o il controllo negativo, e analisi del ciclo cellulare è stata eseguita mediante FACS. Percentuale di cellule in G1, S e G2 / M sono rappresentate nel grafico. Qui sono illustrati una tipica analisi FACS plot (E) e un grafico che rappresenta la media \pm SEM dei risultati di tre esperimenti indipendenti (F). (Deborah A. Greer Card et al. 2008).

Trasfettando cellule HeLa con il pre-miR-302a o con un controllo negativo del pre-miR si osserva un incremento della fase S e della fase G2/M nella popolazione, oltre che una diminuzione del numero di cellule in fase G1. Risultati simili si osservano utilizzando anche cellule MCF-7 (*Deborah A. Greer Card et al. 2008*).

Per investigare l'effetto dell'espressione del miR-302 sul ciclo cellulare delle cellule hESC, è stata inibita la funzione del miR-302a, -b, -c, and -d nelle hESCs con una sequenza specifica a singolo strato inibitrice di acidi nucleici (*anti-miR-302*). L'analisi delle hESCs trasfettate con l'anti-miR-302 mostra un incremento della popolazione delle cellule in fase G1 rispetto alla popolazione di cellule trasfettate con il controllo, una sequenza casuale inibitrice di acido nucleico. Questi risultati dimostrano che l'inibizione del miR-302 nelle hESCs causa un cambio nel profilo del ciclo cellulare. Si sa che le hESCs presentano una bassa espressione della ciclina D1 e una breve fase G1 (*Savatier P et al 1996*) che è regolata da un pathway, oltre che dall'azione di RB, mediata dal complesso ciclina D/Cdk4. Inoltre il sito di legame del miR-302 con il 3' UTR della ciclina è altamente conservato. L'analisi tramite Western Blotting del lisato delle hESC e la qRT-PCR (Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR) dimostrano che con l'aumento della differenziazione, il livello della proteina ciclina D1 diminuisce, ma ci sono solo piccoli cambi nel livello dell'mRNA della ciclina D1. Inoltre si è visto che il complesso ciclina D1/Cdk4 è correlata con una diminuzione dell'attività della chinasi nelle cellule staminali di topo (mESC) (*Deborah A. Greer Card et al. 2008*).

Il risultato dell'analisi della sequenza del miR-302a ha rivelato un potenziale sito di legame alla sequenza 3' UTR di Cdk4. Le kinasi Cdk2, Cdk4 e Cdk6 sono tutte espresse a bassi livelli nelle cellule pluripotenti e ad alti livelli nelle cellule differenziate mediante trattamento con acido retinoico (RA). Perciò, il miR-302 potrebbe legarsi a questi mRNA e regolare la loro espressione. Per determinare se, effettivamente il miR-302 reprime a livello post-trascrizionale la ciclina D1 nelle hESCs, è stata inibita la funzione del miR-302a, -b, -c, e -d con l' anti-miR-302: in queste condizioni i livelli della proteina ciclina D1 aumentano, ma non si riscontrano cambi nel livello dell'mRNA della ciclina D1. Questi dati confermano che il mir-302 reprime trascrizionalmente la ciclina D1 nelle hESCs (*Deborah A. Greer Card et al. 2008*). I livelli delle proteine Oct4 e Sox2 delle cellule trasfettate con l'anti-miR-302 e del controllo, sono equivalenti, a indicare che queste cellule non si sono differenziate. Analizzando con una qRT-PCR le cellule Hela trasfettate con il pre-miR-302a, una

molecola precursore del miRNA maturo e con il controllo negativo pre-miRNA, una sequenza precursore che non codifica per nessun miRNA conosciuto, si osserva una significativa diminuzione della proteina ciclina D1 nelle cellule trasfettate con il premiR-302a e nessuna variazione a livello dell'mRNA rispetto al controllo (il significato non è del tutto comprensibile). Inserendo la sequenza in 3' UTR della ciclina D1 riconosciuta dal miR-302a in un plasmide che esprime il gene della luciferasi e utilizzando una regione mutata come controllo, è stata osservata una riduzione dell'attività della luciferasi (e quindi una riduzione dell'espressione della regione inserita nel plasmide) dei campioni rispetto al controllo. Questo dimostra che il miR-302 attua una repressione diretta della ciclina D1. Inibendo il miR-302 nelle hESC si osserva anche un incremento della proteina Cdk4, che risulta quindi essere un bersaglio del miR-302. Inoltre la trasfezione del pre-miR-302a nelle Hela causa il decremento della proteina Cdk4, dimostrando che è un bersaglio del miR-302 anche in un sistema eterologo (*Deborah A. Greer Card et al. 2008.*)

2.4 SCR (Somatic Cell Reprogramming) e miR-302

L'inizio del reprogramming delle cellule somatiche (SCR) comporta meccanismi altamente coordinati di metilazione del DNA e degli istoni, tali da alterare la struttura della cromatina e l'attività dei geni. Utilizzando diversi programmi di predizione dei bersagli del miRNA-302 è stato trovato che l'istone demetilasi specifico per la lisina (namely AOF, KDM or LSD) e la proteina legante la CpG metilata (MECP) sono i due maggiori gruppi della regolazione epigenetica legati dal mir-302. AOF contiene due membri famigliari AOF1 and AOF2, che reprimono la trascrizione dei geni mediante demetilazione della lisina 4 dell'istone 3 (H3K4). Nei topi transgenici knockout, la perdita di AOF1 o AOF2 aumenta sostanzialmente la metilazione di H3K4 e il silenziamento sia di AOF1 che di AOF2 è sufficiente a indurre una demetilazione globale del DNA.

Shi-Lung Lin. et al. 2010 hanno inoltre dimostrato che l'espressione ectopica del cluster del miR-302 induce non solo la demetilazione globale tramite il silenziamento di MECP1-p66 e di MECP2 ma anche la co-espressione dei geni Oct3/4–Sox2–Nanog, che inducono il reprogramming sia delle cellule umane normali che di quelle cancerose in uno stato di pluripotenza simile a quello delle hES L'analisi tramite Western blot ha messo in evidenza che le human hair follicle cells (hHFC) esprimono alti livelli di AOF2 e MECP1/2 ma bassi livelli di AOF1, ad indicare che il silenziamento di AOF2

gioca un maggior ruolo nel reprogramming delle hHFC. AOF2 è richiesto per stabilizzare la DNA metiltransferasi 1 (DNMT1) e preservare la sua attività di mantenimento della metilazione globale. La riduzione di DNMT1 rende il genoma delle cellule staminali pluripotenti indotte dal miR-302 (mirPS) suscettibili all'attività di demetilazione, il cui effetto viene inoltre aumentato tramite la co-soppressione di MECP1/2 (con riduzioni del $96\pm 1\%$ e $81\pm 5\%$, rispettivamente) e può comportare la demetilazione globale e l'attivazione di Oct3/4–Nanog. Diversi esperimenti indicano che la demetilazione globale indotta dal mir-302 è concentrazione dipendente e necessita della co-soppressione di AOF1/2 e MECP1/2 (*Shi-Lung Lin. et al. 2010*).

La differenziazione neuronale può essere indotta nelle cellule mirPS da una data quantità dell'oligonucleotide anti-mir-302 a conferma del ruolo critico della concentrazione del mir-302 nel mantenimento della staminalità delle cellule pluripotenti. Infatti microiniettando AOF2 ricombinante nei nuclei delle cellule differenziate, queste richiedono una concentrazione più alta di miR-302 rispetto alle cellule prive di AOF ricombinante per diventare cellule mirPS. Questi dati dimostrano anche che a causa della co-interazione tra il miR-302 e AOF2, l'SCR è un processo reversibile.

2.5. P63 e miR-302

Uno screen basato sull'immunofluorescenza ha identificato il miR-302 come antagonista dell'espressione di p63. p63 è un'isoforma del soppressore dei tumori p53 ed è essenziale per diversi importanti meccanismi durante lo sviluppo come l'arresto del ciclo cellulare, l'apoptosi nelle cellule germinali e l'attivazione dell'apoptosi in risposta al danno al DNA. Infatti p63 determina la rapida apoptosi degli oociti in risposta all'irradiazione ed è stato definito essere un guardiano della linea germinale, in parallelo al ruolo di p53 come guardiano del genoma. Cellule di cancro testicolare come GH e 833KE presentano un livello di mRNA e di proteina del p63 minore rispetto ai testicoli sani ed alti livelli di miR-302. Il miR-302 è stato trovato anche nel seminoma e nel carcinoma embrionale: sebbene il trattamento con l'inibitore dell'istone Deacetilasi (HDAC) aumenti i livelli di p63 in queste cellule, si osserva un ulteriore incremento con il blocco del miR-302. Questo conferma che il miR-302 contribuisce alla soppressione di p63 in queste cellule tumorali (*A. H. J. Scheel, et al. 2009*).

La p63 è presente in tre isoforme, alfa, beta e gamma. L'isoforma gamma è stata trovata nei testicoli di topo a livelli inusuali alti ed è caratterizzata da un'estremità

carbossiterminale alternativa e da una corrispondente differenza al 3' terminale del suo mRNA. Il miR-302 si lega alle isoforme alpha e beta di p63 ma non all'isoforma gamma. Inoltre si pensa che il miR-302 abbia bersagli addizionali oltre la p63 la cui repressione promuove il cancro ai testicoli (*Andreas Hans Joachim Scheel et al. 2009*).

2.6 miR-302 e cellule tumorali germinali

La maggiorparte dei miRNA differenzialmente espressi nei Tumori a Cellule Germinali pediatriche (GCT) sono deregolati, come è stato osservato anche per altri tipi di cellule maligne. La più significativa differenza di espressione è la regolazione positiva dei miR-371–373 e del cluster del miR-302. Tramite qRT-PCR si è visto che tutte le cellule maligne gonadali adulte e pediatriche GCT mostrano un aumento del livello di espressione del cluster del miR-302 rispetto al tessuto non maligno di controllo. Questi dati suggeriscono che l'espressione del cluster del miR-302 nelle GT maligne rappresenta la persistenza di un pattern embrionale dell'espressione dei miRNA che non è presente nei tessuti normali e nei teratomi o l'acquisizione di una ri-espressione, regolata da meccanismi sconosciuti (Palmer et al., 2010). È stata osservata un'associazione tra i livelli del miR-302 e l'overespressione di fattori di trascrizione. L'analisi tramite Sylamer suggerisce fortemente che l'overespressione del cluster del miR-302 è funzionalmente importante nelle GCT maligne perchè riduce globalmente i livelli degli mRNA bersaglio. Si osservano arricchimenti degli esameri GCACTT della regione complementare alla sequenza seed miR-302a–302d in geni sottoespressi nelle pediatriche maligne GCTs, nelle cellule tumorali dello Yolk Sac Tumor (YST) e nelle Cellule Endoteliali (EC) rispetto al controllo non maligno e nelle YST adulte rispetto al controllo testicolare. Utilizzando l'analisi GO si può osservare che per per le GCT pediatriche maligne, YST e per il seminoma, gli mRNA deregolati contengono la regione complementare seed corrispondenti con la seed del miR-302a–302d che media processi cellulari importanti nell'oncogenesi e nella progressione maligna, in contrasto con il piccolo numero di processi metabolici identificato dai miRNA deregolati privi della comune regione complementare seed. Insieme questi dati indicano il significato funzionale generale del miR-302 nella biologia delle GCT maligne.

Anche le cellule staminali germinali multipotenti adulte (maGSC) presentano un alto livello di espressione del miR-302. E' stato indotto il differenziamento di queste cellule con RA e si è osservata nel tempo la variazione dell'espressione del miR-302 e dei marker di pluripotenza come Oct4. Il quinto giorno di differenziazione si osserva un

aumento del livello di espressione del miR-302 che poi diminuisce progressivamente con la progressione della differenziazione. Il decimo giorno si osserva una forte diminuzione dei livelli di Oct4. Dato che il profilo di espressione di Oct-4 non corrisponde a quello della famiglia del miR-302 questi risultati suggeriscono che il miR-302 è più connesso con la risposta delle cellule pluripotenti alla differenziazione che con lo stato di cellule differenziate (*Zovoilis et al., 2008*).

3. *Cellule staminali*

Le cellule staminali sono cellule primitive non specializzate (indifferenziate) dotate della singolare capacità di trasformarsi in diversi altri tipi di cellule del corpo.

Per poter essere definita come staminale una cellula deve soddisfare le seguenti proprietà:

- *Autorinnovamento (self-renewal)* : capacità di compiere un numero illimitato di cicli replicativi mantenendo il medesimo stadio differenziativo.
- *Potenza*: capacità di dare origine ai 3 foglietti embrionali, endoderma, mesoderma ed ectoderma e quindi a ogni tipo di specie cellulare

Sebbene le cellule staminali siano dotate di un potenziale replicativo illimitato, sono normalmente quiescenti (fase G₀ del ciclo cellulare) e solo di rado entrano in mitosi (fa eccezione lo sviluppo embrionale). Infatti la parte più consistente del "lavoro replicativo" che porta all'incremento numerico della progenie delle cellule staminali in funzione dell'accrescimento o della riparazione dei tessuti, viene svolto da cellule non staminali definite progenitori o *Transit Amplifying Cells* (TAC), derivate direttamente dalle cellule staminali, ma parzialmente differenziate e prive della capacità di autorinnovamento. Questa strategia replicativa, che limita il numero di eventi replicativi a cui una cellula staminale va incontro, si fonda probabilmente su due importanti principi tra loro collegati: lo stretto *controllo del numero* di cellule staminali; ogni cellula staminale occupa una propria *niche (nicchia)* biologica definita da un complesso network di segnali biochimici, che probabilmente forniscono anche alla cellula staminale le informazioni necessarie sul momento opportuno per replicarsi.

Conservazione dell'*integrità del genoma* delle cellule staminali: un basso numero di repliche riduce il rischio di danni al DNA, cioè di mutazioni. Le mutazioni a carico delle cellule staminali sono estremamente nocive e pericolose, poiché:

- vengono trasmesse a tutte le generazioni di cellule figlie derivate da quella cellula staminale. Al contrario una mutazione in una TAC si ripercuote solo su di una singola generazione di cellule, che eventualmente dopo un certo tempo verrà comunque sostituita.
- possono indurre la cellula staminale a degenerare in senso neoplastico, diventando una cellula staminale tumorale, cioè una tipologia di cellula probabilmente responsabile del continuo rifornimento di nuove cellule che caratterizza lo sviluppo e soprattutto le recidive dei tumori.

In base alle potenzialità si possono distinguere quattro tipi di cellule staminali:

- Una singola cellula staminale totipotente (ES, *Embryonic Stem Cells*) può svilupparsi in un intero organismo e persino in tessuti extra-embryonali. I blastomeri posseggono questa proprietà.
- Le cellule staminali pluripotenti (PS, *Pluripotent Stem Cells*) possono specializzarsi in tutti i tipi di cellule che troviamo in un individuo adulto ma non in cellule che compongono i tessuti extra-embryonali.
- Le cellule staminali multipotenti (MS, *Multipotent Stem Cells*) sono in grado di specializzarsi unicamente in alcuni tipi di cellule.
- Le cellule staminali unipotenti (US, *Unipotent Stem Cells*) possono generare solamente un tipo di cellula specializzata.

Le cellule staminali sono anche classificate secondo la sorgente di derivazione, come embrionali fetali, amniotiche e adulte.

Le cellule staminali pluripotenti indotte (iPs) sono cellule staminali di recente scoperta, ottenute dalla regressione di cellule adulte (quindi già determinate, ad esempio quelle cutanee) ad uno stato staminale (quindi pluripotente), usando un pool di specifici geni (come Sox2, cMyc, Klf4), immessi tramite un vettore virale; si suppone, quindi, che in futuro tali cellule possano essere utilizzate per ottenere cellule adulte già definite, appartenenti a qualsiasi tessuto o organo.

Le cellule staminali adulte (CSE) sono cellule non specializzate reperibili tra cellule specializzate di un tessuto specifico e sono prevalentemente multipotenti. Queste sono tuttora già utilizzate in cure per oltre cento malattie e patologie. Sono dette più propriamente *somatiche* (dal Greco σῶμα; *sôma* = corpo), perché non provengono necessariamente da adulti ma anche da bambini o dai cordoni ombelicali (sia dal sangue del cordone che dal tessuto del cordone stesso)

Le cellule staminali embrionali (ESC) sono ottenute a mezzo di coltura, ricavate dalle cellule interne di una blastocisti. La ricerca sulle cellule staminali embrionali è ancora ai primi stadi: fare ricerca con cellule umane di questo tipo è una questione controversa: l'utilizzo di ESC ha sollevato un grosso dibattito di carattere etico. Difatti per poter ottenere una linea cellulare (o stirpe, o discendenza) di queste cellule si rende necessaria la distruzione di una blastocisti, un embrione non ancora cresciuto sopra le 150 cellule; Questi embrioni sono le "rimanenze" di inseminazioni artificiali e circa il loro utilizzo in campo di ricerca la loro potenzialità potrebbe essere sfruttata per una ipotetica terapia di un maggior numero di patologie.

Le cellule embrionali germinali (ESG) derivano dalle cellule germinali primordiali delle gonadi del feto e che normalmente sviluppano in gameti maturi. Presentano le stesse caratteristiche delle ES e producono i 3 foglietti embrionali. Variano per le caratteristiche di crescita in vivo e in vitro. Possono essere cresciute per 70-80 duplicazioni e non generano teratomi in cui si distinguono i 3 foglietti embrionali.

Le cellule staminali amniotiche si trovano nel liquido amniotico che circonda il feto durante la gestazione: hanno caratteristiche biologiche molto simili alle staminali embrionali, ma non hanno le controindicazioni di tipo etico legate alla distruzione di un embrione. La ricerca su queste cellule è molto recente, ma sono note molte patologie per le quali è prevista l'applicazione sull'uomo: dalle malattie della retina, al diabete, alle malattie neurodegenerative, alla chirurgia ricostruttiva, alle patologie rare. Le cellule staminali fetali sono cellule con caratteristiche multipotenti, presenti nell'utero nel corso dello sviluppo fetale e vengono ottenute da aborti spontanei o da interruzioni di gravidanza.

3.1 Pathways di staminalità delle cellule staminali embrionali

Leukemia Inhibitory Factor

gp130 è corecettore di numerose citochine (IL-6, IL-11, Ciliary neurotrophic factor).

Il ***LIF-gp130*** è sufficiente per mantenere la pluripotenza in cellule staminali embrionali murine ma non in quelle umane. I pathways attivati da LIF si intersecano con quelli attivati da BMP-4, dando luogo sia a stimoli anti-differenziativi che pro-differenziativi

Bone Morphogenic Protein-4

BMP-4 si lega agli eterodimeri dei recettori Ser-Thr di tipo 1 e 2

Vengono attivati i fattori di trascrizione SMADs che inducono l'espressione di geni inibitori della differenziazione in senso ectodermico.

Oct-4 e Nanog

Oct-4 è un fattore di trascrizione espresso nell'embrione fino alla gastrulazione e permane nell'adulto solo nelle cellule germinali. È fondamentale per il mantenimento del self-renewal e dello stato indifferenziato di una cellula: nelle ESC l'aumento della sua espressione induce differenziazione in senso mesodermico od endodermico, mentre una diminuzione determina una differenziazione cellulare in senso ectodermico.

staminali amniotiche non hanno suscitato problemi etici e possono essere utilizzate ad uso autologo, cioè direttamente sull'individuo stesso. Questo fatto, non è attuabile con quelle embrionali, poiché l'embrione da cui originano è stato distrutto, permette una assoluta compatibilità con il "proprietario", senza alcun problema di rigetto. Il rigetto si può evitare anche con le cellule staminali adulte, ma queste ultime sono più "anziane", con minori capacità differenziative e meno dinamiche rispetto a quelle embrionali, fetali o amniotiche. In sintesi, è possibile affermare che le cellule staminali presenti nel liquido amniotico siano in grado di differenziarsi in molti tipi di cellule adulte, conservando caratteristiche di "gioventù" uniche nel percorso biologico dell'individuo.

3.3 Cellule staminali adulte

Le cellule staminali adulte non sono cellule specializzate e che si riproducono giornalmente per fornire alcune specifiche cellule: ad esempio 200 miliardi di globuli rossi sono generati ogni giorno nel corpo da cellule staminali emopoietiche. Fino a poco tempo fa si pensava che ognuna di queste cellule potesse produrre unicamente un tipo particolare di cellula: questo processo è chiamato differenziazione. Tuttavia, negli ultimi anni si sono avute prove che le cellule staminali possano acquisire molte forme differenti: è noto che cellule staminali nello stroma del midollo osseo possono trasformarsi in cellule epatiche, neurali, muscolari, renali e follicolari. Caratteristiche molto simili o identiche si ritrovano anche nelle cellule staminali contenute nel tessuto adiposo, presenti in abbondanza e facilmente prelevabili con una semplice lipoaspirazione. Il lipoaspirato può essere processato anche immediatamente e rappresenta oggi la fonte più promettente di cellule staminali adulte mesenchimali (CSM). Le cellule staminali adulte potrebbero anche essere più versatili. Ricercatori alla New York University School of Medicine hanno estratto cellule staminali dal midollo osseo di topi, cellule ritenute da loro essere pluripotenti. La trasformazione di un tipo di cellula staminale in un altro viene definita transdifferenziazione; utili fonti di cellule staminali adulte sono in realtà localizzabili in tutti gli organi del corpo. Ricercatori alla McGill University di Montreal hanno ricavato cellule staminali dalla pelle capaci di specializzarsi in molti tipi di tessuto, compresi neuroni, cellule muscolari lisce e cellule adipose. Tali cellule sono state trovate nel derma, lo strato più profondo della pelle: queste cellule staminali giocano un ruolo centrale nella rimarginazione di piccoli tagli. Si ritiene che anche i vasi sanguigni, la polpa dentaria, l'epitelio digestivo, la retina, il fegato ed anche il cervello contengano cellule staminali, utili per la rigenerazione dello

stesso sistema nervoso centrale, cervello e midollo spinale. In Italia, attraverso il Registro Nazionale dei donatori di Midollo Osseo, "IBMDR", è possibile rintracciare un donatore volontario di cellule staminali adulte, per la cura varie malattie, tra cui la leucemia.

3.4 Genesi del cancro: modelli

Nonostante gli enormi progressi relativi alla conoscenza della biologia tumorale, alcune questioni rimangono assolutamente irrisolte. Tra queste assume una notevole importanza il problema della genesi del cancro. E' ampiamente accettato che le alterazioni genetiche abbiano un ruolo preponderante nel determinare il fenotipo tumorale, ma rimane ancora da dimostrare a carico di quale o quali cellule esse inizino. Il tumore si origina, quando eventi genetici ed epigenetici determinano la perdita dei sistemi di controllo del ciclo cellulare interferendo con il suo corretto svolgimento e determinando il passaggio dallo stato di integrità allo stato di instabilità del genoma. Questa condizione è basilare per la trasformazione cellulare poiché favorisce l'acquisizione progressiva di nuove mutazioni. Meccanismi cellulari che intervengono nel mantenimento dell'integrità del genoma, sia a livello di controllo del danno del DNA, sia a livello del controllo della distribuzione dei cromosomi durante la mitosi, contrastano costantemente il processo neoplastico.

A tale riguardo sono stati proposti diversi modelli. Per gran parte del ventesimo secolo, l'iniziazione e la progressione dei tumori è stata spiegata attraverso il modello stocastico. Il modello stocastico sostiene che nell'ambito di un tessuto tutte le cellule siano in grado potenzialmente di dar luogo alla formazione di un tumore, se acquisiscono delle mutazioni, e quindi non è possibile prevedere quale sia quella che svolge un ruolo di iniziazione. Nell'ambito di una popolazione tumorale tutte le cellule avrebbero una sia pur limitata capacità di generare una neoplasia. Il modello della evoluzione clonale ipotizza invece che un tumore derivi da una singola cellula, la quale continua nel tempo ad acquisire nuove mutazioni, originando cloni a proliferazione rapida che hanno la meglio sugli altri. Questo processo seleziona i tipi cellulari più adatti alla crescita illimitata in un determinato ambiente. Secondo questo modello, il tumore è composto da uno o più cloni con uguale grado di crescita. I cloni predominanti mantengono il tumore e conservano la capacità di iniziare la tumorigenesi se impiantati in topi immunodepressi. Le due ipotesi esposte si possono fondere supponendo che la

cellula di origine, una qualunque della popolazione tessutale, vada incontro ad una evoluzione clonale con acquisizione di una serie di mutazioni e così si sviluppi un tumore, con la eventuale collaborazione di elementi stromali, che promuovono la crescita neoplastica.

Il modello presenta due rimarchevoli limitazioni: da un lato non considera che i tumori sono morfologicamente e funzionalmente eterogenei, dall' altro non considera che per riformare un nuovo tumore è necessario un numero abbondante di cellule. Questa osservazione è in contrasto con l'ipotesi che ogni cellula della massa tumorale può causare il tumore (*Sengupta et al., 2010*).

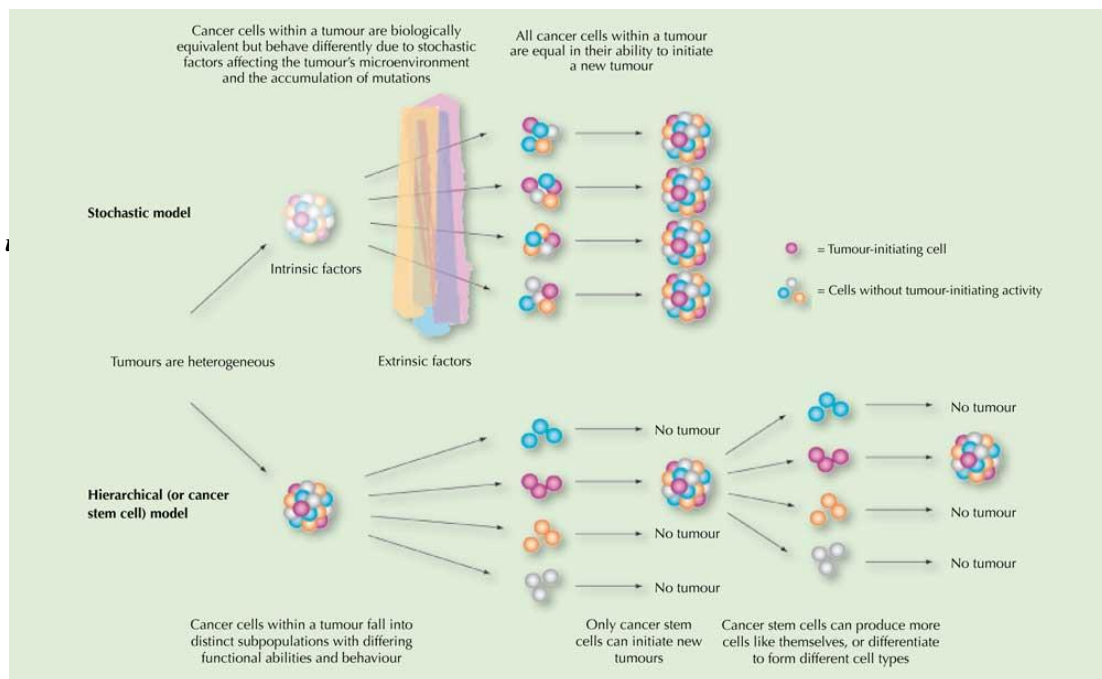


Figura 12: due modelli sul motivo per cui le cellule cancerose cambiano tanto all'interno di un tumore: il modello stocastico e il modello delle cellule staminali cancerose. *American Society of Hematology, di Dick JE (2008) Stem cell concepts renew cancer research. Blood 112(13): 4793-4807. doi: 10.1182/blood-2008-08-077941*

Negli ultimi anni è stato proposto un altro modello, il modello gerarchico, che, al contrario di quello stocastico, propone che il cancro si sviluppi a partire da un piccolo subset cellulare, che rappresenta la versione mutata delle cellule staminali normali. Tali cellule trasformate possono generare degli elementi più o meno differenziati a seconda delle influenze subite all'interno della massa tumorale. Questa popolazione rara di cellule, vengono chiamate cellule staminali del cancro (*cancer stem cells, CSCs*) o

cellule iniziatrici del tumore. Questa popolazione cellulare è reperibile all' interno della massa tumorale e possiede la capacità di auto-rinnovamento (self-renewal), che garantisce l'eterogeneità gerarchica di alcuni tumori e gioca un ruolo cruciale nello sviluppo, nella progressione e nel mantenimento della neoplasia (*Figura 12*). Inoltre, le cellule staminali tumorali non sarebbero responsabili solo dello sviluppo tumorale ma anche dell'aumento dell'aggressività, della recidività e delle metastasi (*Monteiro et al., 2010*).

3.5 Cellule staminali tumorali

Le cellule staminali normali sono cellule non differenziate che possiedono una serie di caratteristiche esclusive tra le quali la capacità di autorinnovarsi, proliferando indefinitamente, e di essere in grado, in particolari condizioni, di differenziarsi. Inoltre esse manifestano la capacità di preservarsi, resistendo agli insulti esterni. Le cellule staminali normali hanno un ruolo critico nello sviluppo, nel mantenimento e nella rigenerazione dei tessuti.

Le principali caratteristiche delle cellule staminali tumorali, *cancer stem cells*, sono l'auto-rinnovamento e la capacità di dare origine a tipi di cellule differenziate (*Clarke, M. F. et al. 2006*). Per la maggior parte dei tumori, le cellule staminali tumorali mancano della pluripotenza che è una caratteristica delle cellule staminali embrionali, essendo in genere limitata alla linea del tessuto da cui sono generate. (*Gu G. et al. 2007*). A questo proposito, le cellule staminali tumorali sono più simili alle cellule staminali adulte coinvolte nella riparazione e rigenerazione dei tessuti durante tutta la vita adulta (*Mackenzie, I. C. 2008*) (Fig. 1). Cellule staminali in tessuti adulti sono state identificate in molti organi, compresa la pelle (basale) (*Mackenzie, I. C. 2006*), i muscoli (cellule satellite) (*Morgan, J. E., & Partridge, T. A. 2003*) e la mammella (nel compartimento mioepiteliale) (*Stingl, J. 2009*). Esse sono caratterizzate da due attributi chiave, il *self-renewal* e la capacità di ricostituire tutte le linee che compongono il tessuto di origine. Per questa ragione, le cellule staminali adulte possono essere considerate multipotenti (anziché pluripotenti come le cellule staminali embrionali), in quanto posseggono un limitato grado di plasticità dello sviluppo che consente la differenziazione in ciascuna delle linee richieste. Ad esempio, il tessuto mammario comprende due distinte linee cellulari; le cellule luminali che formano gli alveoli e sono responsabili per la produzione di latte, e le cellule mioepiteliali caratteristiche della linea delle strutture

ramificate duttali. Le cellule staminali (CD44^{high}CD24^{low}) in un tessuto di seno normale risiedono nel compartimento mioepiteliale, ma sono comunque in grado di differenziare sia in linee luminale che in linee mioepiteliali (*Stingl J. et al. 2009*). Cellule staminali tumorali del seno presentano lo stesso fenotipo, CD44^{high}CD24^{low} e sono anch'esse multipotenti, essendo in grado di differenziare in entrambi le linee epiteliale e mesenchimale (*Mani SA 2008 ; Mackenzie, I. C. et al. 2008*).

Le CSC sono estremamente resistenti alla chemioterapia e alla radioterapia e compongono così una piccola riserva di cellule responsabili delle recidive tumorali e della formazione di metastasi. Questo le rende l'oggetto principale di studi miranti a trovare terapie adeguate a colpirle, eradicando il cancro. La resistenza esibita dalle CSC sarebbe legata ad una più elevata espressione di pompe di membrana implicate nell'espellere gli agenti chemioterapici dalle cellule, a meccanismi di riparazione del DNA molto attivi e a vie di inattivazione dei farmaci più sviluppate. Le cellule staminali normali mantengono le loro caratteristiche grazie all'organizzazione del microambiente in cui vivono (nicchia). Esse non hanno una localizzazione casuale, ma si trovano piuttosto concentrate intorno ai vasi sanguigni, che collaborano, insieme a componenti della matrice extracellulare e in concerto con altri elementi inclusi quelli del sistema immunitario, a regolare il ritmo di proliferazione e l'inibizione dell'apoptosi e a garantire il mantenimento dell'immatùrità peculiare delle staminali. Alterazioni della nicchia possono contribuire alla trasformazione delle staminali normali in CSC. Le sfide in cui è impegnata la ricerca relativa alle CSC sono sostanzialmente dettate dalla necessità di conoscerne meglio le peculiarità, il potenziale di autorinnovamento e le tappe differenziative. Un aspetto molto importante è rappresentato dalla individuazione di marker significativi che ne consentano l'isolamento e l'espansione per supportare programmi su larga scala per lo studio di nuovi farmaci. In particolare si studiano le possibilità di indurre il differenziamento o uno stato di senescenza o di arresto del ciclo cellulare nelle CSC con la finalità di renderle vulnerabili alla chemioterapia o alla radioterapia. E' largamente accettato che il glioblastoma multiforme (GBM) si sviluppi sulla base del modello gerarchico.

3.6 Origine delle cellule staminali tumorali

L'origine e la relazione delle CSCs con le cellule staminali adulte rimane a tutt'oggi elusiva (Wu *et al.*, 2008) (Figura 13). Alcuni autori hanno postulato che le CSCs derivano da cellule staminali adulte mutate (Reya *et al.*, 2001) sostenendo che, tali cellule, possono causare tumorigenesi alterando i pathways che regolano l'auto-rinnovamento. Esse infatti impiegano, nel processo ontogenetico, i medesimi pathways coinvolti nel self-renewal delle cellule staminali adulte tissutali, le quali sono normalmente presenti nei tessuti e sono responsabili del loro regolare rinnovamento.

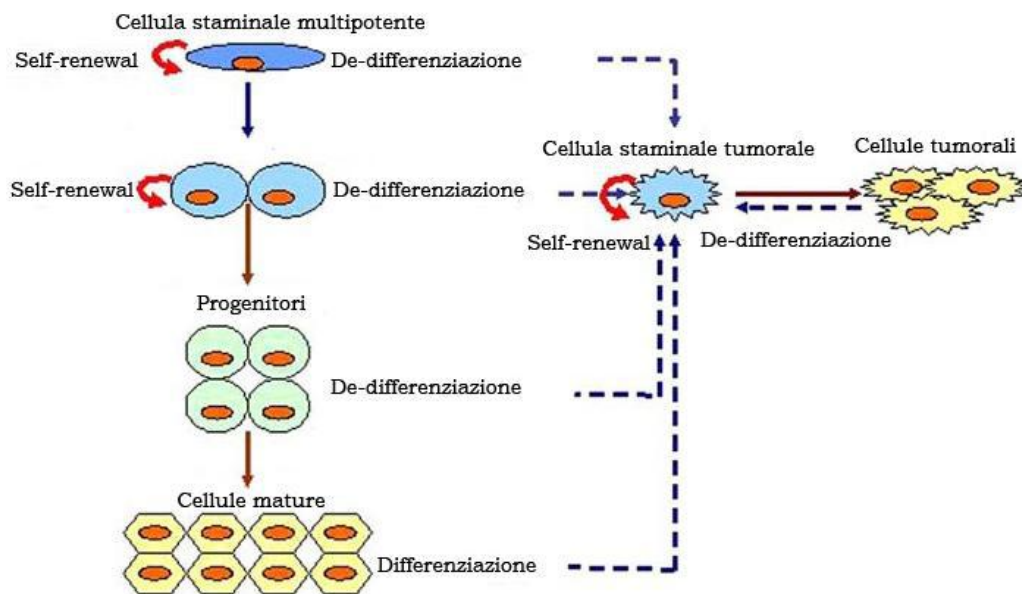


Figura 13.

Origine delle cellule staminali tumorali (modificata da Wu, 2008).

Sebbene questo sia il caso più probabile, non tutte le cellule tumorali che derivano da cellule staminali adulte mutate sono inevitabilmente cellule staminali tumorali. Al contrario, è stato speculato che le CSCs possono derivare da trasformazioni oncogeniche di *transit amplifying cells* (Clarke *et al.*, 2006), da cellule progenitrici (Krivtsov *et al.*, 2006; Jamieson *et al.*, 2004) oppure, da cellule differenziate (Sun *et al.*, 2005). E' stato suggerito, infatti, che cellule somatiche differenziate possono riacquisire proprietà stem-like per riattivazione di pathways che promuovono l'auto-rinnovamento associato alla trasformazione neoplastica (Welte *et al.*, 2010).

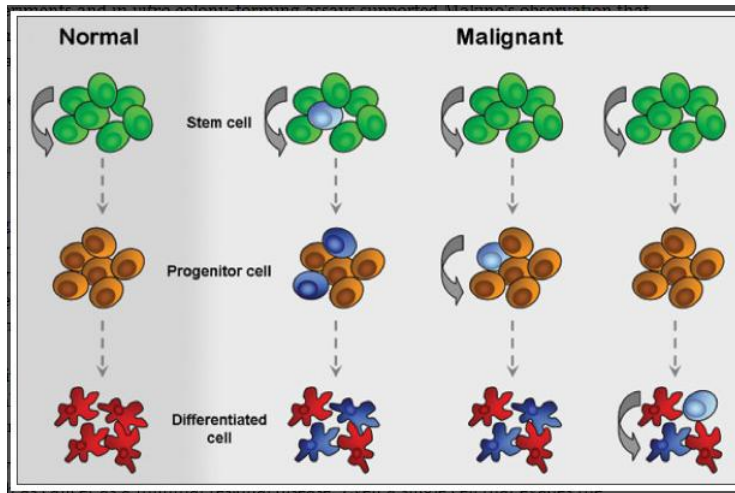


Figura 14.
Origine delle cellule staminali tumorali.

Nel tessuto normale, le cellule staminali (verde) si dividono asimmetricamente in cellule progenitrici (arancione) da cui poi si producono cellule terminalmente differenziate (rosso) (a sinistra). Nella tumorigenesi le mutazioni possono trasformare le cellule staminali in

cellule staminali tumorali (blu chiaro) per poi portare a cellule progenitrici tumorali differenziate e cellule tumorali (blu scuro). Ma anche, da mutazioni nello sviluppo delle cellule progenitrici e le cellule differenziate possono riacquistare proprietà simili alle cellule staminali e si trasformano in cellule staminali tumorali (a destra). (Welte et al., 2010).

Come le cellule staminali adulte, anche le CSCs sono state per la prima volta identificate nel sistema ematopoietico. Le prime evidenze sulla loro esistenza sono state ottenute negli anni '90, grazie a studi sulla leucemia mieloide acuta (AML). *Lapidot* e i suoi collaboratori dimostrarono che solo una piccola popolazione di cellule tumorali leucemiche, con fenotipo CD34+/CD38-, aveva la capacità di formare il tumore una volta inoculata in un topo NOD/SCID (*non-obese diabetic, severe combined immunodeficient*) (*Lapidot et al., 1994*). Il fenotipo di queste cellule era simile a quello delle cellule staminali normali ematopoietiche e suggeriva, quindi, che esse potevano derivare da cellule staminali adulte mutate (*Bonnet et al., 1997*).

L'identificazione di cellule staminali leucemiche ha alimentato nuove ricerche su altri tipi di tumore portando alla dimostrazione dell'esistenza di CSCs anche nei tumori solidi. Successivamente, le cellule staminali tumorali sono stati identificate usando marcatori diversi nei tumori cerebrali (CD133 +) (*Singh et al., 2003*), nel cancro del seno (CD44^{high}CD24^{low}ESA +) (*Al-Hajj et al. 2003*), nel carcinoma a cellule squamose orale (CD44^{high}) (*Locke M et al. 2005 ; Prince ME et al. 2007*) nel cancro del pancreas (CD44 + CD24 + ESA +) (*Li C et al 2007*) nel cancro alla prostata (CD44 +) (*Patrawala L et al. 2006*) e altri carcinomi.

Al-Hajj e collaboratori (2007) furono i primi a identificare e isolare una subpopolazione di cellule dal tumore al seno. Tali cellule avevano la capacità, *in vivo*, di formare il

tumore in topi immunodepressi, mentre la restante popolazione cellulare del tumore aveva questa capacità solo quando iniettata in alta dose. Iniettando circa 100 cellule CD44+CD24-/low si formava il tumore mentre la popolazione con fenotipo diverso non era in grado di formarlo.

Risultati simili sono stati ottenuti nei tumori cerebrali. In questo caso, le cellule staminali tumorali erano positive per il marcatore CD133 (*Singh et al., 2003*). Molto più recentemente simili risultati sono stati raggiunti con altri tipi di tumori, tra i quali il tumore polmonare (*Kim et al., 2005*), il tumore del colon (*O'Brien et al., 2007*), dell'ovaio (*Zhang et al., 2008*), del pancreas (*Li et al., 2007*), della prostata (*Lang et al., 2009*) e della tiroide (*Malaguarnera et al., 2010*). L'insieme di tutti questi risultati ha quindi portato a favorire il modello delle cellule staminali tumorali rispetto al modello stocastico. Mentre, il modello stocastico prevede che tutte le cellule del tumore siano capaci, teoricamente, di dare origine e promuovere la crescita tumorale, il modello della CSCs propone, invece, che solo una rara popolazione di cellule ne sia capace. Tuttavia, va sottolineato che i due modelli non sono necessariamente mutualmente esclusivi e caratteristiche del modello stocastico possono entrare in gioco all'interno della subpopolazione delle cellule staminali tumorali (*Chang et al., 2008*). Il modello mantiene quindi, delle basi sperimentali solide e le differenze sulla frequenza delle CSCs osservate tra i diversi tumori riflette il diverso tipo di neoplasia ed organismo ospite utilizzato nella sperimentazione (*Gupta et al., 2009*).

Data l'ampia diversità delle caratteristiche attribuite alle cellule staminali tumorali, l'Associazione Americana per la Ricerca sul Cancro (AACR), nel 2006, ha pensato di uniformare il concetto definendo la cellula staminale tumorale come “una cellula all'interno del tumore che possiede la capacità di self-renewal e causa l'eterogeneità delle cellule all'interno della massa tumorale” (*Clarke et al., 2006*).

E' stato inoltre dimostrato che le cellule con fenotipo simil-staminale sono capaci di resistere alla chemioterapia convenzionale, causando la ricomparsa del tumore dopo che questo è stato asportato (*Baguley et al., 2006*). La conoscenza dei meccanismi che portano allo sviluppo del tumore e la comprensione di quelli implicati nella farmacoresistenza aprono nuovi orizzonti per lo sviluppo di farmaci mirati innovativi.

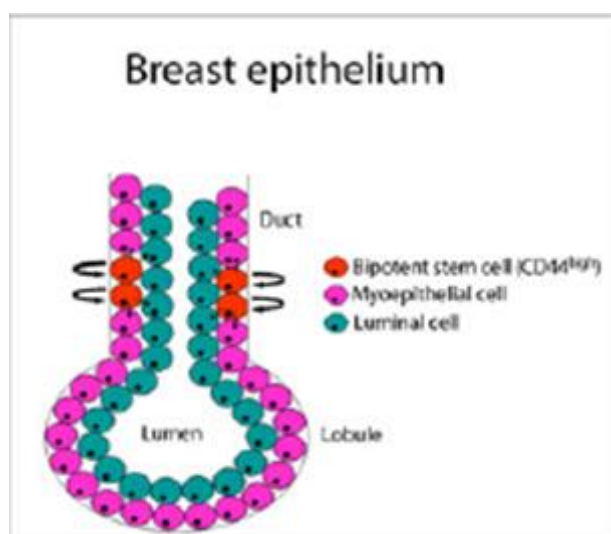
3.7 Divisioni delle cellule staminali

Le cellule staminali (CSs) somatiche hanno la capacità di rimanere quiescenti o possono dividersi dando origine a due cellule figlie, una staminale e l'altra che invece procede verso la differenziazione per mantenere l'omeostasi del tessuto. Questo tipo di divisione viene detta asimmetrica. Tale strategia permette, con un'unica divisione, di gestire sia il comparto staminale che quello delle cellule differenziate; tuttavia, in situazioni particolari, quali un danno tissutale, le cellule staminali vanno incontro a divisione simmetrica per permettere la variazione del numero di cellule nei due compartimenti (*Morrison et al., 2006*). In questo caso una cellula staminale darà origine a due cellule figlie uguali che saranno entrambi staminali oppure andranno incontro a differenziazione, perdendo di conseguenza le caratteristiche di staminalità e diventando cellule differenziate (CD). I meccanismi che mantengono l'equilibrio tra queste due strategie o che permettono la scelta di una rispetto all'altra sono stati finora poco indagati. Uno studio recente (*Kahn, 2011*) sostiene che l'andare incontro ad una divisione simmetrica piuttosto che ad una asimmetrica sia un punto critico e fondamentale nella differenza tra una CS e una CSC. Sembra che la decisione sia regolata da coattivatori della catenina, dalla proteina CBP (*CREB-binding protein*) e dalla p300. Un incremento di trascrizione di CBP/catenina a discapito della trascrizione di p300/catenina incrementa il numero delle divisioni simmetriche e questa strategia sembra favorita dalle CSCs rispetto alle CS adulte.

4. Il cancro della mammella

4.1 Classificazione dei sottotipi

Il cancro della mammella è una malattia eterogenea caratterizzata da un ampio spettro di variabili cliniche, patologiche e molecolari che può rendere conto delle diverse risposte alle terapie. Il cancro della mammella è secondo solo al cancro al polmone come causa di morte per le donne e la maggior parte dei casi che portano al decesso, sono legati a metastasi. Quindi, la comprensione dei meccanismi molecolari e cellulari della



metastasi è necessaria per una prognosi accurata e per lo sviluppo di trattamenti specificamente mirati alle cellule metastatiche.

L'epitelio mammario è costituito da due strati cellulari, luminale e basale. Le cellule del lume espongono una chiara morfologia epiteliale, con complessi giunzionali ed una polarità apico-basale, esprimono inoltre marker luminali/epiteliali come la E-caderina.

Lo strato basale dell'epitelio duttale mammario è composto da cellule mioepiteliali. Questi tipi di cellule differenziate sono probabilmente la progenie di uno o più tipi di cellule staminali mammarie che risiedono anche nello strato epiteliale. Per diversi anni la pratica clinica è stata guidata dai risultati delle metanalisi e da una classificazione esclusivamente morfologica del carcinoma della mammella (in cui gli istotipi neoplastici più frequenti sono il *carcinoma duttale* e *lobulare*). Molto prima dell'avvento delle moderne tecniche di profiling molecolare, gli istopatologi avevano riconosciuto che il cancro al seno era eterogeneo attraverso osservazioni morfologiche. La classificazione era basata sulle seguenti misure: il tipo istologico, il grado del tumore, lo stato del linfonodo e la presenza di marker predittivi come ER e, più recentemente, HER2 *human epidermal growth factor receptor 2*. Lo sviluppo del profilo molecolare mediante *microarray* di DNA ha confermato questa eterogeneità. Ricerche di “*gene expression profiling*” hanno permesso di individuare alcuni sottogruppi molecolari con implicazioni clinico-prognostiche e terapeutiche. Il profilo di espressione genica ha contribuito ad una classificazione più sofisticata che comprende i

sottogruppi *Luminal A*, *Luminal B*, *Basale-like*, *HER2-positivo* e normale. Recentemente le scelte terapeutiche sono influenzate dalle acquisizioni della biologia molecolare e dal *gene profiling*. (*Perou CM et al.1999; Perou et al. 2000*). Caratteristiche molecolari di questi sottotipi sono riassunti nella Tabella 2. Ogni sottotipo ha una prognosi diversa ed una specifica risposta al trattamento (*Sørli T et al. 2001*). Perché ER è un obiettivo terapeutico, i sottotipi luminal A e B sono sensibili alla terapia ormonale. Allo stesso modo il gruppo di HER2 sono potenziali candidati per la terapia *trastuzumab*. In mancanza di espressione di un bersaglio terapeutico riconosciuto, i tumori basali risultano essere difficili da trattare, si presentano biologicamente più aggressivi e spesso hanno una prognosi sfavorevole. Poiché il fenotipo basale è caratterizzato dalla mancanza di espressione di ER α , PR e HER2, è talvolta indicato come triplo negativo (*triple negative*). Anche se ci sono analogie tra i fenotipi basali e triplo-negativi, i termini non sono strettamente intercambiabili, come indicato in una recente recensione, non vi è ancora una definizione unificante per i cancri basali e, mentre il triplo-negativo contribuisce al cancro al seno basale, i fenotipi non sono identici (*Badve S. et al. 2011*) Più recentemente il sottotipo *claudin-low* è stato descritto interrogando stabiliti dataset umani e murini (*Herschkowitz JI et al. 2007*). Inizialmente erano stati raggruppati con il sottotipo basale a causa della mancanza di espressione di ER α , PR e HER2 e perché associati ad una prognosi sfavorevole. Questo tipo di tumori, invece, hanno mostrato la loro unicità per una serie di peculiarità: la *downregulation* di claudin-3 e claudinin-4, la bassa espressione del marcatore di proliferazione Ki67, l'incremento di marcatori associati alla transizione epitelio-mesenchimale e l' espressione di caratteristiche associate alle cellule staminali del cancro della mammella (CSC) (ad esempio, CD44 + fenotipo CD24-/low) (*Prat A et al. 2010*).

Table 1

Molecular classification of breast carcinoma

Classification	Immunoprofile	Other characteristics	Example cell lines (adapted from [13,22])
Luminal A	ER ⁺ , PR ^{+/−} , HER2 [−]	Ki67 low, endocrine responsive, often chemotherapy responsive	MCF-7, T47D, SUM185
Luminal B	ER ⁺ , PR ^{+/−} , HER2 ⁺	Ki67 high, usually endocrine responsive, variable to chemotherapy. HER2 ⁺ are trastuzumab responsive	BT474, ZR-75
Basal	ER [−] , PR [−] , HER2 [−]	EGFR ⁺ and/or cytokeratin 5/6 ⁺ , Ki67 high, endocrine nonresponsive, often chemotherapy responsive	MDA-MB-468, SUM190
Claudin-low	ER [−] , PR [−] , HER2 [−]	Ki67, E-cadherin, claudin-3, claudinin-4 and claudinin-7 low. Intermediate response to chemotherapy	BT549, MDA-MB-231, Hs578T, SUM1315
HER2	ER [−] , PR [−] , HER2 ⁺	Ki67 high, trastuzumab responsive, chemotherapy responsive	SKBR3, MDA-MB-453

EGFR, epidermal growth factor receptor; ER, oestrogen receptor; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; PR, progesterone receptor.

Holliday and Speirs *Breast Cancer Research* 2011 13:215 doi:10.1186/bcr2889

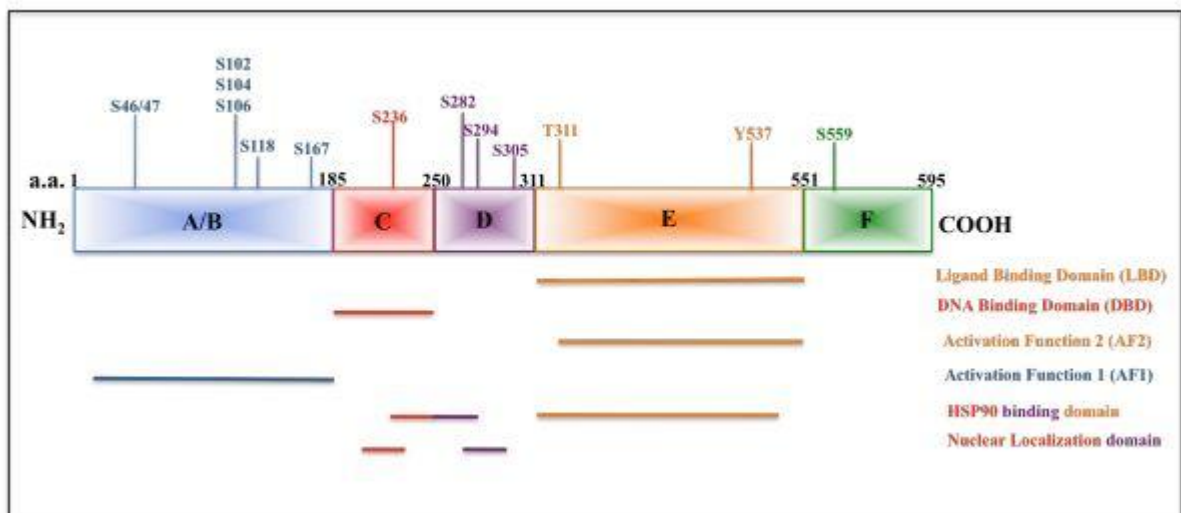
4.2 Il recettore degli estrogeni

Gli estrogeni sono ormoni sessuali steroidei, molecole a 18 atomi di carbonio (C18), contenenti 3 cicloesani (A, B, C) ed un ciclopentano (D); l'anello A è fenolico (un anello aromatico con un gruppo idrossilico sul carbonio 3) e l'anello D può avere un gruppo β -idrossilico o un chetone in posizione 17. Gli estrogeni sono formati a partire dal colesterolo e l'androstenedione o il testosterone sono i precursori immediati. La reazione coinvolge l'aromatizzazione dell'anello A ed è catalizzata in 3 tappe dal complesso enzimatico monoossigenasi (aromatasi) che utilizza come co-substrati il NADPH e l'ossigeno molecolare (*Miller WL. 1988*). I precursori estrogenici vengono principalmente sintetizzati nelle ovaie, nei testicoli e nelle ghiandole surrenali. Gli estrogeni naturali più importanti nell'uomo sono il 17β -estradiolo (E2), seguito dall'estrone (E1) e dall'estradiolo (E3). L'anello fenolico A è la principale caratteristica strutturale responsabile del legame selettivo ad alta affinità ai recettori per gli estrogeni (*Jordan VC et al. 1985; Duax WL et al. 1988*). Accanto al principale ruolo nella regolazione dello sviluppo e delle funzioni nel sistema riproduttivo, gli estrogeni esplicano importanti effetti anche in altri tessuti e sistemi, essendo fattori che regolano la trascrizione genica. Il recettore degli estrogeni (ER) nell'uomo appartiene alla famiglia nucleare dei recettori ormonali, la sua attivazione è ormono-dipendente. Il recettore degli estrogeni svolge un ruolo significativo nello sviluppo degli adenocarcinomi degli organi riproduttivi (*Basu A Rowan BJ 2005*). L'espressione dei recettori steroidi e la proliferazione sono strettamente regolati nella ghiandola mammaria normale, ma non nei tumori maligni. Nella ghiandola mammaria normale vi è una minima espressione di ER α (*Saji S. et al. 2000 ; Clarke et al. 1997*). L'espressione di ER α aumenta quando le cellule mammarie normali proliferano come nel caso della gravidanza o nel periodo della pubertà (*Russo J et al.*). Tuttavia nel carcinoma mammario ER α aumenta di espressione, questo pare verificarsi nelle prime fasi della progressione da una forma premaligna ad una maligna, pare che queste cellule tumorali continueranno ad esprimere ER α (*Anderson E et al. 2004*). I tumori al seno ER-negativi sono scarsamente differenziati e si presentano più aggressivi (*Fujimoto N et al. 2004*). La differenza di espressione di ER nelle cellule normali (bassa espressione di ER α) e nelle cellule tumorali (variabile espressione di ER α) solleva la questione sul perché ER α è assente sia nelle cellule

epiteliali mammarie normali che nei tumori mammari con prognosi peggiore, mentre è presente nelle cellule epiteliali mammarie nei tumori luminali.

4.2.1 Recettori degli estrogeni e loro meccanismo d'azione

Gli effetti biologici degli estrogeni sono mediati dal legame di questi ormoni ad uno specifico recettore (ER) intracellulare, appartenente alla superfamiglia dei recettori nucleari dei fattori di trascrizione. Il recettore esiste in due isoforme, ER α (*pm 66 kDa*) ed ER β (*pm 56 kDa*) che sono espresse in modo diverso in vari tessuti e quindi si pensa abbiano funzioni diverse (*Sorlie T et al. 2003*). Entrambe le isoforme hanno una struttura conservata che consta di cinque diversi domini che includono il dominio E, che



contiene la regione di legame (LBD) o AF2. La regione AF2 (“Activation Function 2”) è una regione importante per l'inizio e l'attivazione geni target di ER. (*Leo C et al. 2000*) Esso contiene i domini di legame (cavità) per il ligando e i *binding site* per i coattivatori o corepressori (*Shah YM, Rowan BG 2005*). In seguito al legame del ligando alla regione LBD, ER α forma un dimero cui segue la fosforilazione di ER. La fosforilazione permette l'inizio della trascrizione dei gene target di ER (*Shah YM, Rowan BG 2005; Nilsson S et al. 2001, Kato S et al. 1995*). La regione ammino-terminale, detta "A/B domain", è la meno conservata e contiene un dominio detto AF-1 (“Activation Function 1”), che stimola la trascrizione dei geni bersaglio in modo indipendente dal ligando 171 C'è un'altra differenza tra la trascrizione genica avviata dalla regione AF2 rispetto alla regione AF-1 diversa dalla dipendenza del ligando. Il numero dei geni che possono essere trascritti tramite la regione AF1 non è copiosa come i geni attivati trascrizionalmente tramite la regione AF2 e anche l'attività trascrizionale di AF1 è più debole. 172. Il legame

della proteina ER α al sito sul ERE del DNA avviene tramite il dominio C sulla proteina ER, che è quello più conservato. Il dominio C è detto anche dominio di legame DNA (“DNA Binding Domain”, DBD) 173. Il dominio che collega il dominio E (AF-2) e il dominio C (DBD) è detta regione cerniera (“hinge”)171 e può anche contenere sequenze di localizzazione nucleare (“Nuclear Localization Signal”, NLS). La regione carbossi-terminale F che è poco conservata ed è presente solo in alcuni recettori nucleari, tra cui entrambe le isoforme dei recettori per gli estrogeni. (*Zhao L et al. 2005; Ascenzi P et al.2006*). Il 17 β -estradiolo (E2) diffonde attraverso la membrana (*MacGregor JI, Jordan VC 1998*) e nel momento in cui l’ormone si lega al proprio recettore, quest’ultimo dimerizza, dal citoplasma trasloca nel nucleo, e si lega a specifiche sequenze di DNA dette “estrogen response elements” (ERE), che sono localizzate a livello dei promotori di geni specifici, dando luogo ad effetti definiti “genomici” (*Nilsson, S. et al. 2001*). L’attività trascrizionale dei due ER dipende dalla loro capacità di reclutare coattivatori e corepressori, che regolano in maniera opposta l’assemblaggio del complesso di inizio della trascrizione (*Ascenzi P et al. 2006*). In recenti studi è stata messa in evidenza l’esistenza di varianti di ER α a più basso peso molecolare rispetto a quella di 66 kDa (*Zhao et al. 2005*). Tra queste varianti l’isoforma di 46 kDa è stata identificata in vari tipi cellulari come linee cellulari di carcinoma mammario umano (MCF-7), osteoblasti, e cellule endoteliali vascolari; tale proteina, priva della regione amminoterminale (“A/B domain”), contenente il dominio AF-1, è in grado di formare eterodimeri con l’isoforma di 66 kDa, inibendo in maniera competitiva il legame di quest’ultima al DNA (*Flouriot G. et al. 2000 ; Denger S. et al 2001 ; Li L. et al. 2003*). Sebbene tale attività sembra essere importante nella regolazione della proliferazione cellulare, il ruolo specifico dell’isoforma di 46 kDa non è stato ancora ben chiarito. Negli ultimi anni è stato dimostrato che gli estrogeni possono indurre molto rapidamente, entro anche pochi minuti, alcune risposte cellulari, che non hanno, quindi, il tempo di poter essere mediate da proteine trascritte e sintetizzate *ex novo*, in seguito al legame con i recettori intracellulari. Questi effetti così rapidi, mediati dagli estrogeni, e definiti “non genomici”, avvengono attraverso l’attivazione di ER presenti sulla membrana plasmatica cellulare (mER). Essi presentano una struttura simile a quella dei recettori intracellulari ed innescano rapidamente una cascata di trasduzione del segnale mediata da proteine chinasi come la proteina chinasi attivata da mitogeni/regolata dai segnali extracellulari (MAPK/ERK), le proteine chinasi A e C (PKA e PKC) e la fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K) (*Marino M & Ascenzi P. 2008 ; Levin 2009*). Gli effetti rapidi indotti dal legame

degli estrogeni con i mER possono interferire e modulare quelli “genomici” mediati dai ER intracellulari, coinvolgendo segnali sia intermedi che a valle della cascata di trasduzione del segnale (*Bjornstrom, L. & Sjoberg 2005 ; . Zhang, D. & Trudeau, V.L 2006*). Alcuni studi hanno dimostrato che i mER sono localizzati all'interno delle caveole, piccole invaginazioni della membrana plasmatica, ricche di colesterolo e sfingolipidi, e caratterizzate dalla presenza di proteine denominate caveoline, che, interagendo con le molecole della via di trasduzione del segnale, ne innescano l'attivazione. Il trasporto del recettore degli estrogeni all'interno di tali strutture è consentito dal legame tra il suo residuo di *serina 522* e la *caveolina-1* 18. *Marino e collaboratori* hanno inoltre osservato che il residuo di *cisteina 447*, presente nella regione E dell'isoforma ER α , può subire una modificazione post-traduzionale di palmitoilazione, ossia legarsi, mediante legame tioestereo, ad una unità di acido palmitico. Anche tale modificazione consente il legame con la caveolina-1. Il processo di palmitoilazione, oltre ad essere necessario per la localizzazione dei ER a livello della membrana plasmatica, svolge un ruolo importante nell'induzione dei segnali rapidi di trasduzione che modulano la proliferazione cellulare, mediante le proteine chinasi ERK e PI3 (*Pedram A 2006*). È stato dimostrato che il legame di mER al proprio ligando modula la palmitoilazione di ER α e di ER β ; in particolare, in linee tumorali, la stimolazione con estradiolo consente, da un lato, la dissociazione di ER α dalla caveolina-1, con conseguente innesco di segnali di proliferazione cellulare, e, dall'altro, aumenta l'associazione tra ER β e caveolina-1, con conseguente attivazione della proteina chinasi p38, e quindi induzione del processo apoptotico (*Acconcia F et al. 2005 ; Galluzzo P et al. 2007*). ER sulla membrana plasmatica rappresentano il 5-10% del totale di ER in vari tipi cellulari. Tale percentuale include sia ER α che ER β , ma è stata osservata una diversa espressione delle due isoforme a seconda del tipo cellulare. Ad esempio, nelle cellule endoteliali vascolari sono state rilevate in membrana entrambe le isoforme (*Guo X et al. 2005*), mentre nelle linee cellulari MCF-7 risulta essere espressa in membrana principalmente ER α e scarsamente ER β (*Pedram A 2006*).

4.2.2 Recettori degli estrogeni e il ciclo cellulare

ER alpha e ciclo cellulare

Il ciclo cellulare è regolato da ER α in quanto modula la progressione delle cellule attraverso le fasi S e G2 / M del ciclo cellulare. Quando il ligando è legato ad ER α aumenta la progressione del ciclo passando dalle fasi S e G2 / M, al contrario si è osservato che ER α non legato, agisce come un inibitore del ciclo cellulare. Per analizzare ulteriormente la regolazione del ciclo cellulare in seguito agli effetti del legame tra il ligando e ER α , il saggio di luciferasi ha mostrato che la trascrizione di geni bersaglio come il Recettore del progesterone (PgR) e la proteina Trefoil (pS2) aumentano durante le fasi S e G2 / M quando ER α è associato al ligando. Inoltre, è stata dimostrata mediante immunoprecipitazione la formazione di complessi tra la ciclina B e ER α e questo ha portato alla scoperta che il complesso che promuove l'anafase (APC) è la ligasi E3 sia per la ciclina B sia per ER α al termine della fase M. Questi risultati suggeriscono che ER α non legato ha un effetto inibitorio sulla progressione del ciclo cellulare. Quindi è ragionevole ipotizzare che la combinazione di droghe che abbassano i livelli di estrogeno (così come gli inibitori delle aromatasi) ma che preservano la degradazione di ER α potrebbero fornire un esito migliore per il trattamento del cancro al seno. APC funziona come E3 ligasi per ER α e quindi può fornire un target per disegnare uno specifico inibitore della degradazione di ER α .

4.3 Ruolo dei microRNA nel cancro della mammella

Nel corso degli ultimi anni, lo studio di *profiling* di microRNA hanno portato alla identificazione dei miRNA che sono espressi nel cancro della mammella in maniera aberrante. In particolare, è stata approfondita la funzione di alcuni di questi miRNA. Come in altri tipi di cancro, alcuni miRNA possono avere funzione di soppressori tumorali ed altri invece quella di oncogeni tumorali. Quindi, la formazione di tumori possono derivare da una riduzione o eliminazione di un miRNA soppressore del tumore e /o da un'amplificazione o *up-regulation* di un miRNA oncogeno. Inoltre, le metastasi tumorali possono essere promosse dalla espressione di miRNA pro-metastasi e /o *down-regulation* di miRNA antimetastasi.

4.3.1 miRNA come tumor suppressor

Sono noti sette miRNA che inibiscono la formazione del tumore al seno e /o metastasi.

miR-206

Il ruolo potenziale di miR-206 nel cancro al seno è stato inizialmente identificato con l'impiego di *microarray* per miRNA confrontando l'espressione nei tessuti normali ed in quelli tumorali (*Iorio MV et al. 2005*). Nel cancro al seno ER α -negativi si è trovata una espressione up-regulated suggerendo quindi il ruolo nella regolazione del gene degli estrogeni ER α (ESR1). Infatti è stato recentemente dimostrato che il miR-206 inibisce l'espressione di ESR1 legandosi a due siti di legame nella 3'UTR del gene (*Adams BD et al. 2007*). Studi più recenti hanno inoltre dimostrato l'esistenza di un feedback a retroazione in cui l'espressione del miR-206 viene repressa da antagonisti di ER α , ma non da antagonisti di ER β o progesterone. Un altro studio ha dimostrato che l'espressione di miR-206 nei tessuti umani di cancro al seno ER α -positivi risulta nella down-regolazione di ER α , e nella inibizione della crescita nella linea cellulare MCF7. Inoltre *Leivonen SK et al. (2009)* hanno trovato che l' mRNA di ESR1 era un bersaglio diretto del miR-18a, miR-18b, miR-193b e miR-302C in cellule di carcinoma mammario (*Leivonen SK et al. 2009*) con conseguente induzione dell'arresto del ciclo cellulare e proliferazione estrogeno-indotta, a livelli comparabili a quelli di RNA interference (siRNA).

Table 1. miRNAs and their targets in breast cancer cells			
miRNA	Target	Functional pathway	Reference
Tumor suppressor miRNAs			
miR-206	ESR1	ER signaling	[28,33]
miR-17-5p	AIB1, CCND1, E2F1	Proliferation	[37,38]
miR-125a, b	HER2, HER3	Anchorage-dependent growth	[40,41]
miR-200	BMI1, ZEB1, ZEB2	TGF- β signaling	[47,52,54]
let-7	H-RAS, HMGA2, LIN28, PEBP1	Proliferation, differentiation	[73-75]
miR-34a	CCND1, CDK6, E2F3, MYC	DNA damage, proliferation	[76-78]
miR-31	FZD3, ITGA5, M-RIP, MMP16, RDX, RHOA	Metastasis	[61]
Oncogenic miRNAs			
miR-21	BCL-2, TPM1, PDCC4, PTEN, MASPIN	Apoptosis	[64-67]
miR-155	RHOA	TGF- β signaling	[68]
miR-10b	HOXD10	Metastasis	[69]
miR-373/520c	CD44	Metastasis	[79]

miRNAs and their targets in breast cancer. Several studies have identified altered miRNA expression profiles in breast cancer. The loss of several tumor suppressor miRNAs and overexpression of oncogenic miRNAs leads to loss of regulation of several cellular functions that may be involved in breast cancer pathogenesis.

Tabella 1.
miRNA e target nelle cellule tumorali di cancro al seno.

Il ruolo soppressore del miR-206 nel cancro al seno è stato ulteriormente suffragato dalla recente dimostrazione che il miR-206, il miR-335 ed il miR-126 sono potentemente inibiti in cellule metastatiche di cancro al seno rispetto alle cellule parentali (*Tavazoie SF et al.2008*). Ripristinando l'espressione di questi tre miRNA è stata ridotta la capacità invasiva. *Tavazoie SF et al. (2008)* hanno descritto quattro target diretti del miR-335, PTPRN2, MERTK, TNC e SOX4, tra di loro, TNC (che codifica un componente della matrice extracellulare) e SOX4 (che codifica un fattore di trascrizione che è coinvolto nella tumorigenesi) hanno dimostrato di essere target funzionali implicati nelle metastasi. Il ripristino della espressione del miR-206 in cellule metastatiche non ha influenzato la loro proliferazione o la loro sensibilità all'apoptosi, ma hanno presentato un'alterata morfologia cellulare, eventualmente contribuendo ad una diminuzione della motilità cellulare che potrebbe limitare la migrazione delle cellule metastatiche (*Tavazoie SF et al.2008*). Queste scoperte, suggeriscono che il miR-206 potrebbe essere un candidato nuovo per la terapia al cancro al seno.

miR-17-5p

Il miR-17-5p, anche noto come miR-91, si trova sul cromosoma 13q31, una regione genomica che subisce perdite di eterozigotità in tumori multipli, compresi il cancro al seno (*Eiriksdottir G et al. 1998*). Un target diretto è l'oncogene AIB1 (amplificato nel cancro al seno) (*Hossain A. et al.2006*). La proteina codificata dal gene AIB1 è un recettore steroide co-attivatore che aumenta l'attività trascrizionale di ER α , E2F1 (che è direttamente regolata anche da miR-17-5p) altri geni e fattori di trascrizione. La soppressione di AIB1 dovuta al miR-17-5p ha effetti sulla proliferazione estrogeno stimolata e sulla proliferazione delle cellule del cancro alla mammella estrogeno / ER-indipendente (*Hossain A. et al.2006*). Nelle cellule di cancro al seno, il gene ciclina D1 (CCND1), che è sovra-espresso in circa il 50% dei tumori umani, è stato recentemente identificato come un bersaglio diretto di miR-17-5p (*Yu Z et al.2008*). Il miR-17-5p inibisce la proliferazione delle cellule tumorali del seno sopprimendo la sintesi della proteina ciclina D1 e questo effetto è stata abrogato da un siRNA CCND1 in cellule di cancro al seno ciclina D1-deficienti. Questo studio inoltre identifica un meccanismo a feedback retroattivo in cui la ciclina D1 induce l' espressione di miR-17-5p, limitando la stessa espressione della ciclina.

miR-125a e miR-125b

Il gene HER2 (ERBB2) codifica un recettore membro della famiglia dei fattori di crescita epidermico tirosina chinasi. Questa proteina non ha un dominio di legame-ligando proprio, pertanto non può legare fattori di crescita. Tuttavia, si lega strettamente ad altri membri della famiglia dei recettori dei fattori di crescita per formare un etero dimero, stabilizzando l'attività di legame del ligando e migliorando l'attivazione chinasi-mediata delle vie di segnalazione a valle come quelle che coinvolgono la proteina chinasi mitogena (MAPK) e fosfatidilinositolo 3-chinasi (*Baselga J, Swain SM 2009*). L'amplificazione e / o up-regulation di questo gene è stato riportato in numerosi tumori, compresi tumori al seno. miR-125a e miR-125b sono inibiti in tumori della mammella in cui il gene HER2 è amplificato e sovraespresso (*Mattie MD et al.2006*). Questi due miRNA sono potenziali soppressori tumorali e la loro sovraespressione in cellule SKBR3 (un HER2-dipendente umano tumore mammario linea cellulare) sopprime HER2 e HER3 mRNA e proteine, portando ad una riduzione della crescita ancoraggio-dipendente, la motilità cellulare, e invasività (*Scott GK et al.2007*). Tuttavia, questa influenza è sottile in cellule tumorali al seno non trasformate HER2-indipendenti (MCF10A).

La famiglia del miR-200

L'invasione e le metastasi sono le caratteristiche della progressione tumorale maligna. Una crescente evidenza indica che l'attivazione della 'transizione epitelio-mesenchimale' (EMT) un caratteristico programma embrionale, promuove i processi di distacco di cellule uno dall'altro consentendo così l'aumento della mobilità delle cellule tumorali e la diffusione (*Thiery JP et al. 2009*). Negli ultimi anni, è diventata chiara la comprensione che l'attivazione aberrante di EMT è responsabile della trasformazione di molti tumori umani maligni. La EMT è attivata da repressori trascrizionali inclusi i membri della famiglia *Snail* e la famiglia di fattori di trascrizione ZFH (*Peinado H et al. 2009*). Queste proteine inibiscono la trascrizione di geni epiteliali, come quello che codifica *E-caderina*. Recentemente è stato dimostrato che ZEB1, un membro della famiglia ZFH, è un attivatore determinante della EMT nei tumori umani, tra cui il cancro al seno (*Aigner K et al. 2007; Dohadwala M et al. 2006*), e si è visto promuovere le metastasi delle cellule tumorali in un modello di topo xenograft (*Spaderna S et al. 2008*).

E' stato osservato che la famiglia del miR-200 sono gli induttori fondamentali del fenotipo epiteliale in quanto sopprimono l'espressione degli induttori della EMT, ZEB1 e ZEB2. Gregory et al. hanno indotto la EMT in cellule umane MDCK (cellule epiteliali renali di Madin Darby canine) sia con il fattore di crescita trasformante (TGF)- β o sia attraverso l'espressione stabile di PEZ, una tirosina fosfatasi. Gli autori hanno trovato che tutti i cinque membri della famiglia del miR-200, che si trovano in cluster su due posizioni genomiche, erano down-regolati durante l'induzione della EMT da parte del TGF- β . Studi funzionali hanno dimostrato che l'inibizione di miR-200 a, b, e c in cellule MDCK innescano la EMT TGF- β -indipendente associata ad un aumento di espressione di *vimentina*, *fibronectina* e *N-caderina*, e una down-regulation di E-cadherina. Al contrario, la sovraespressione dei membri della famiglia del miR-200 in cellule mesenchimali hanno innescato il processo inverso di transizione mesenchima-epiteliale. Saggi di luciferasi hanno confermato che ZEB1 e ZEB2 sono sotto controllo diretto della famiglia del miR-200. La rilevanza clinica di queste scoperte su ulteriori analisi di tessuti umani di cancro al seno, ha inoltre suggerito che una diminuzione della famiglia del miRNA-200 è stato associato ad un fenotipo di tumore al seno molto aggressivo e metaplastico. La scoperta che l'espressione di ZEB1 e ZEB2 è controllata dalla famiglia miR-200 suggerisce che la sottoregolazione di questi miRNA è un passo essenziale all'inizio della metastasi tumorale. Risultati sovrapponibili sono stati ottenuti in un altro studio, che ha impiegato un pannello di 60 linee cellulari di tipi umani di tumore differenti NCI-60 (Park S-M et al. 2008). Utilizzando due marcatori, gli autori hanno diviso le linee cellulari in due gruppi principali, un fenotipo epiteliale (contrassegnato da E-cadherina) ed un fenotipo mesenchimale (contrassegnato da *Vimentina*) e hanno trovato che la famiglia del miR-200 era fortemente associata al fenotipo epiteliale. La sovraespressione del miR-200 ha indotto la differenziazione epiteliale in linee di cellule tumorali al seno indifferenziate (MDA-MB231), mentre antagonisti del miR-200 nel cancro colon-rettale hanno indotto una fenotipo EMT nella linea cellulare HCT116. ZEB1 e ZEB2 sono stati nuovamente rilevati come target dei miR-200 membri della famiglia. Questi ed altri recenti studi sulla famiglia del miR-200 (Hurteau GJ et al. 2009 ; Korpál M et al. 2008) aggiungono questi miRNA alla crescente lista di importanti miRNA associati al tumore. Inoltre, un recente studio ha dimostrato che l'espressione della famiglia miR-200 era diminuita da Akt2, suggerendo che, in molti casi, le metastasi del cancro al seno possono essere sotto il controllo del pathway *Akt-miR-200-E-cadherina* (Iliopoulos D et al. 2009). È interessante notare che un recente studio ha dimostrato che

l'espressione di miR-200 in modo imprevisto aumenta le metastasi avanzate macroscopiche in linee cellulari nel cancro al seno murine (*Dykxhoorn DM et al. 2009*). Questi risultati suggeriscono che, per alcuni tumori, la colonizzazione tumorale a siti metastatici potrebbe essere aumentata dalla transizione mesenchimale-epiteliale e che la natura epiteliale di un tumore non può prevedere l'esito nelle metastasi. Il lavoro di O'Day et al. è il primo lavoro a mostrare un legame diretto tra la famiglia del miR-200 e le metastasi, ma variazioni dei livelli della famiglia del miR-200 sono normalmente associati ad una maggiore tumorigenesi. Per esempio, il miR-200 è upregolato nei tumori ovarici umani rispetto al tessuto ovarico normale (*Iorio MV et al. 2007*). Inoltre, la sovraespressione della famiglia del miR-200 è correlata alla ridotta sopravvivenza. I pazienti con tumori ovarici con elevata espressione di miR-200a hanno dimostrato di avere circa il 50% di diminuzione del tempo di sopravvivenza media rispetto a coloro che non mostrano significativi cambiamenti nella sua espressione. Inoltre è stato osservato che la regione del cromosoma 1 che codifica il cluster del miR-200 è amplificata in diversi tumori epiteliali - cancro ovarico, carcinoma mammario e melanoma (*Zhang L et al. 2006*). Un nuovo studio (*Shimono Y et al. 2009*) ha rivelato il ruolo di tre gruppi di miRNA (miR-200c-141, miR-200b-200a-429 e miR-183-96-182) nella regolazione di *self-renewal* delle cellule staminali tumorali e normali. Questi miRNA sono down regolati nel cancro al seno umano ,nelle cellule staminali umane e nelle cellule staminali / progenitrici mammarie murine , nonché nel carcinoma delle cellule embrionali. Shimono Y et al. hanno dimostrato che BMI1 (un gene che promuove nelle cellule staminali il self-renewal) è specificamente inibito da questi miRNA e hanno dimostrato che la sovraespressione ectopica di miR-200c in cellule di carcinoma embrionale hanno provocato un ritardo nella crescita e la differenziazione neurale ed hanno soppresso la tumorigenicità delle cellule staminali del cancro al seno in vivo (*Wellner U et al. 2009*) Nel loro insieme, questi studi suggeriscono che la famiglia del miR-200 gioca un importante ruolo nel regolare la progressione del tumore e delle metastasi.

La famiglia let-7

let-7 è un miRNA altamente conservato in tutto il phyla animalia, è il fondatore della classe dei miRNA. E' stato scoperto svolgere un ruolo nel timing dello sviluppo in *C. elegans* (*Reinhart BJ et al. 2000*) . let-7 è scarsamente espresso o eliminata in molti tumori umani. Dati recenti ottenuti da studi su neoplasie ematologiche e su tumori solidi

suggeriscono che ciascuna di essi includono sub-popolazioni minori di cellule che sono in grado della iniziazione tumorale (*Clarke MF, Fuller M 2006*). Queste cellule “*tumor-initiating cells*” (cellule T-CI) hanno proprietà delle cellule staminali tumorali e possono andare incontro a divisione cellulare asimmetrica e *self-renewal*. Le T-CI comprendono solo una piccola frazione della massa di cellule più differenziate nel tumore. Basata sull’ipotesi delle *cancer stem cells*, le T-IC sono responsabili della iniziazione, progressione, metastasi del tumore e della resistenza alla terapia. Le T-IC del seno (*Breast tumor initiating cells*, BT-CI) possono essere arricchite purificando le cellule in base al fenotipo CD44 + CD24-/low o purificando gli ammassi sferici di cellule auto-replicanti (mammosfere) da sospensioni cellulari. Un recente studio ha confrontato l’espressione dei miRNA nelle cellule *self-renewing* e nelle cellule differenziate di linee di cancro al seno. E’ stata osservato che l’espressione di let-7 è fortemente ridotto nelle BT-IC mentre aumenta con la differenziazione. (*Yu F et al. 2008*). Introducendo let-7 nelle BT-IC è stata ridotta la loro capacità proliferativa, la loro capacità di formare mammosfere e la formazione di tumori e metastasi in vivo. Al contrario, silenziando let-7 si ha un maggiore self-renewal di di cellule non-T-IC in vitro. I target di let-7 sono noti oncogeni, come ad esempio H-RAS e HMGA2. Silenziando H-RAS in una linea cellulare arricchita di BT-IC- ha ridotto il self renewal, ma non ha avuto effetto sulla differenziazione, mentre silenziando HMGA2 si è avuto un maggiore effetto sulla differenziazione, ma non sul self renewal. Questi risultati suggeriscono che let-7 regola una serie di proprietà delle BT-IC simili alle proprietà delle cellule staminali e che let-7 può offrire l’opportunità unica di attaccare le cellule staminali tumorali utilizzando RNA terapeutici.

Il delivery del miRNA let-7 ai tumori potrebbe ridurre le cellule staminali inducendo la differenziazione. Un report recente ha collegato la proteina RKIP (proteina chinasi Raf inibitoria) a let-7 ed alle metastasi del cancro al seno. RKIP (chiamato anche PEBP1) inibisce MAPK e la cascata di segnalazione di NF-kB (*Dangi-Garimella S et al. 2009*). Gli autori hanno scoperto che RKIP inibisce l’ invasione metastatico delle cellule tumorali del seno e reprime il travaso delle cellule tumorali e le metastasi ossee in un modello murino. L’inibizione di MAPK diminuisce la trascrizione di LIN28 da parte di MYC, a sua volta, la down regulation di LIN28, un inibitore della biogenesi di let-7, aumenta l’espressione di let-7 in cellule di carcinoma mammario che portano alla diminuita espressione di HMGA2, una proteina chromatin-remodeling che attiva geni che favoriscono l’invasione e la metastasi, tra cui Snail. Collettivamente, le loro scoperte,

indicano che RKIP sopprime l'invasione e le metastasi tramite una cascata di segnali che coinvolge MAPK, MYC, LIN28, let-7, e a valle i target di let-7 come HMGA2.

miR-34a

Il miR-34a è uno dei diversi miRNA che sono downregolati in cancro multipli [26] ed è stato dimostrato che regolati da p53. Nel contesto del cancro al seno, solo uno studio (*Kato M et al. 2009*) ha dimostrato che i livelli di miR-34a erano più bassi nelle linee di cancro al seno triple negative e nelle linee mesenchimali rispetto alle linee di cellule epiteliali e quelle HER-2+. Gli autori propongono che le mutazioni di p53 in questi sottotipi di cancro al seno potrebbe contribuire ad abbassare l'espressione del miR-34a. Per chiarire il rapporto tra miR-34a e radiosensibilità in queste cellule, gli autori hanno confrontato la sensibilità di una linea normale del seno epiteliale (HMEC), una linea di HER-2 + (UACC812) e una linea mesenchimale (MDA-MB-231) e hanno trovato che la linea cellulare MDA-MB-231 (con bassi livelli di miR-34a) era significativamente più sensibile alle radiazioni rispetto alla HMECs o UACC-812 (con alti livelli di miR-34a). Livelli incrementati di miR-34a hanno protetto le cellule MDA-MB-231 dalla morte cellulare indotta dalle radiazioni, mentre il decremento aveva l'effetto contrario. Questi risultati mostrano che miR-34a è necessario per la sopravvivenza delle cellule MDA-MB-231 dalla morte cellulare non-apoptotica e suggeriscono che il miR-34a può avere un potenziale terapeutico nei tumori al seno, in quanto contrapponendosi al miR-34a si aumenta la sensibilità delle cellule del cancro al seno verso radiazioni.

miR-31

E' stato recentemente dimostrato che il miR-31 previene le metastasi in vari stadi inibendo l'espressione di geni che favoriscono le metastasi (*Valastyan S et al. 2009*). Il miR-31 è espresso in cellule del seno normali e la sua abbondanza è stata dimostrata essere dipendente dallo stato metastatico del tumore. L'espressione del miR-31 è moderatamente ridotto in linee cellulari non-metastatiche di tumore mammario ed è quasi impercettibile nelle metastasi sia nel topo che nell'uomo. È importante sottolineare che gli autori hanno dimostrato che l'introduzione di miR-31 in cellule di carcinoma mammario metastatico sopprime funzioni relative la metastasi (la motilità, l'invasione e la resistenza alle anoikis) in vitro e metastasi in vivo. In particolare, hanno trovato che sebbene nelle cellule tumorali mammarie sovra-esprimenti il miR-31 si formino tumori

più grandi e proliferativi, questi tumori sono stati ben incapsulati e quindi meno invasivi, suggerendo che il miR-31 inibisce le metastasi nei primi stadi della cascata della metastasi. Iniettando direttamente nella circolazione il miR-31 nelle cellule sovraespressanti è impedita la capacità delle cellule di sopravvivere e di formare tumori secondari nel polmone, suggerendo che il miR-31 inibisce le metastasi in più passaggi della cascata metastatica. Al contrario, l'inibizione di miR-31 porta ad un aumento di funzione della invasività e promuove le metastasi in vivo.

Sei target di miR-31 in cellule umane di cancro al seno putativi sono stati validati: *frizzled3* (Fzd3), *integrina α -5* (ITGA5), *miosina*, *phosphatase-Rho-interacting protein* (M-RIP), *matrix metalloproteinasi 16* (MMP16), *radixina* (RDX) ed un membro della famiglia del gene RAS (RhoA). È interessante notare che la ri-espressione di tre di questi geni, ITGA5, RDX e RhoA, in cellule di carcinoma mammario metastatico hanno abrogato i difetti conferiti da miR-31 sulla motilità, sulla invasione e sulla resistenza all'anoikis, suggerendo che questi tre geni sono funzionalmente target importanti del miR-31. Presi insieme, i risultati dimostrano che il miR-31 può anche essere un attraente bersaglio terapeutico per il cancro al seno per la sua azione antimetastatica esercitata a più livelli nella cascata metastatica su geni che favoriscono le metastasi.

4.3.2 MiRNA oncogeni

miR-21

Il miR-21 è stato trovato essere costantemente sovraespresso in molti tumori, tra cui il cancro al seno (*Iorio MV et al. 2005; Volinia et al. 2006*). Coerentemente con tali scoperte, il miR-21 è stato anche dimostrato essere altamente *upregolato* nei tumori del seno rispetto ai tessuti normali in 157 casi di pazienti in cui i miRNA sono stati analizzati mediante real-time RT-PCR array (*Si M-L et al. 2007*), suggerendo che miR-21 può funzionare come un oncogene. Uno studio più recente ha anche esaminato il ruolo oncogenico di miR-21 in coltura cellulare e in eterotrapianti topo. Sebbene l'effetto del silenziamento del miR-21 sulla sopravvivenza delle cellule è stato marginale (25% riduzione), gli autori hanno trovato che l' inibizione della crescita aumenta quando in cellule MCF-7 transfettate vengono trattate con il farmaco antitumorale *topotecan*, suggerendo che la soppressione di miR-21 può sensibilizzare le cellule tumorali agli agenti antitumorali. Per approfondire se il silenziamento del miR-21 da solo abbia effetto sulla tumorigenesi, hanno iniettato cellule MCF7 silenziate nel tessuto mammario di

nude-mice. I tumori derivati da cellule MCF-7 transfettate con anti-miR-21 erano solo la metà di quelli derivati dalle cellule transfettate con il controllo negativo, mentre antiKi-67 ha indicato che la crescita del tumore è stata ridotta probabilmente da una minore proliferazione causata da anticorpi anti-miR-21. Questi risultati mostrano che il miR-21 è un miRNA oncogeno che svolge un ruolo importante nella tumorigenesi. Gli autori hanno anche scoperto che silenziando il miR-21 le cellule MCF-7 entrano in apoptosi e questo è stato associato con una minore espressione della proteina Bcl-2 sia in cellule MCF7 transfettate con anti-miR-21 sia in tumori derivati da queste cellule, a riprova del fatto che Bcl-2 può essere un bersaglio indiretto di miR-21. Per chiarire ulteriormente i meccanismi molecolari che regolano la funzione di miR-21, l'analisi proteomica dei suddetti tumori trapiantati hanno rivelato che l'oncosoppressore tropomiosina proteina 1 (TPM1), che è noto per essere *downregolato* in linee cellulari epiteliali di cancro al seno, è un target di miR-21. Nel contesto del cancro al seno, il miR-21 ha anche dimostrato di inibire l'espressione dell'oncosoppressore PDCD4 (morte cellulare programmata-4). Sebbene l'esaurimento della proteina di PDCD4 in cellule MCF-7 da siRNA PDCD4 non ha effetto sulla proliferazione cellulare, significativamente ha attenuato l'effetto di inibizione antiproliferativo di miR-21, sottolineando un ruolo essenziale per PDCD4 come mediatore degli effetti biologici di miR-21 in cellule di carcinoma mammario (Frankel LB et al. 2008). Un altro target importante di miR-21 è il gene soppressore *Phosphatase and tensin homolog* (PTEN) (Qi L et al. 2009). Oltre a TPM1 e PDCD4, uno studio identifica anche Maspin come un target diretto di miR-21 (Zhu S et al. 2009). È stato dimostrato che questi tre geni riducono l'invasività di una linea di cellule metastatiche di cancro della mammella (Zhu S et al. 2007). Le loro scoperte, consolidano ulteriormente il ruolo di miR-21 come un miRNA oncogeno e suggeriscono che miR-21 ha un ruolo non solo nella crescita del tumore, ma anche nelle metastasi tumorali e l'invasione prendendo di mira più geni anti-metastatiche.

miR-155

Il miR-155 è over-espresso in un numero di neoplasie tra cui il cancro al seno[28,62]. Un recente studio ha dimostrato che il miR-155 è up-regolato nelle cellule della ghiandola mammaria normale murina (NMuMG cells) attraverso il pathway TGF- β /Smad4 e l'induzione TGF- β -mediata di EMT e l'invasione cellulare (Kong W et al. 2008). Per studiare il ruolo del miR-155 nella EMT TGF- β -indotta, gli autori hanno trovato che l'espressione ectopica del miR-155 nelle cellule NMuMG distrugge la

corretta formazione delle tight junction e promuove la migrazione cellulare e l'invasione. Al contrario, antagonizzando il miR-155 nelle cellule NMuMG si ha la riduzione della EMT TGF- β -indotta e la migrazione cellulare e l'invasione. Il miR-155 direttamente inibisce l'espressione di RhoA, un gene che regola molti processi cellulari, che includono l'adesione cellulare, la motilità, la polarità e è un importante modulatore della formazione delle giunzioni cellulari e della stabilità. Queste scoperte suggeriscono che il miR-155 è regolato dal pathway di TGF- β /Smad4 e down regolato dalla espressione della proteina RhoA per portare alla progressione EMT. Inoltre hanno dimostrato che il miR-155 è associato con l'invasività del cancro nel tumore primario di carcinoma al seno nell'uomo dimostrando che il miR-155 è altamente espresso in tumori invasivi ma non in tessuti non invasivi tumorali. Questi risultati mostrano che il miR-155 è implicato nella EMT ed invasione come osservato in cellule NMuMG e suggerisce che il miR-155 può giocare un ruolo critico nelle metastasi tumorali del cancro al seno.

miR-10b

Il miR-10b è stato il primo miRNA trovato ad avere un effetto sulle potenziali metastasi nelle cellule tumorali umane (*Ma L. et al. 2007*). A differenza del miR-155, che è sovra-espresso in molti tumori della mammella, il miR-10b era altamente espresso solo nelle cellule di cancro metastatico ed è stato trovato promuovere la migrazione cellulare e l'invasione in vitro ed innescare l' invasione e le metastasi tumorali in vivo. L'espressione di miR-10b è stato trovato essere indotto dal fattore di trascrizione Twist, a sua volta, miR-10b inibisce la traduzione del fattore di trascrizione homeobox D10 (HOXD10), risultante in una cascata di alterazioni cellulari che includono espressione del gene prometastatic RHOC (*Ras homologue gene family member C*), un gene che promuove la migrazione e l'invasione delle cellule del cancro.

5. *Transizione epitelio mesenchimale*

I tumori non sono macchinari in grado di proliferare in modo autonomo, ma presentano aspetti molto eterogenei per quanto riguarda la morfologia e gli aspetti funzionali. Infatti, un singolo tumore può presentare aree diverse con comportamenti diversi: proliferazione, arresto del ciclo cellulare, differenziamento epiteliale, adesione cellulare e disseminazione. In accordo a questo modello più dinamico delle SCS la maggior parte dei tipi tumorali derivano da nicchie di cellule staminali caratterizzate da un bilancio finemente coordinato tra automantenimento, migrazione, proliferazione, differenziamento e apoptosi.

Le mutazioni in geni noti per essere responsabili di questo bilanciamento nei tessuti normali danno luogo alla formazione di masse tumorali parzialmente differenziate ed eterogenee che, in seguito a mutazioni addizionali e sotto l'influenza positiva dei fattori microambientali, progrediscono verso il tumore maligno. Le cellule tumorali si staccano dalla massa tumorale per disseminarsi nel microambiente. Riflettono comunque l'eterogeneità del tumore primario e solo in poche, le cellule staminali cancerose migranti, hanno la plasticità necessaria a subire il trans-differenziamento e a migrare e situarsi in organi distali. In accordo a questo, la progressione del cancro verso una forma aggressiva è stata correlata con la perdita dell'identità epiteliale e l'acquisizione del fenotipo migratorio. Questo fenomeno, definito come transizione da epitelio a mesenchima (EMT, *epithelial to mesenchymal transition*), è considerato un evento cruciale nella progressione della malignità. Il processo è essenziale per la generazione di nuovi tipi di tessuto durante l'embriogenesi, e ha un ruolo fondamentale nella infiammazione e cicatrizzazione dei tessuti adulti (Thiery , 2003; Flint et al, 2008). Recentemente è stata associato allo sviluppo tumorale, è stata descritta infatti essere coinvolta nei passaggi fondamentali della tumorigenesi come l'invasione e le metastasi (Sleman, 2000). Ormai è assodato che il processo EMT è importante per l'evoluzione del tumore. Le cellule epiteliali sono cellule altamente polarizzate e sono connesse le une alle altre da giunzioni cellulari. Le cellule di fenotipo mesenchimale invece non stabiliscono contatti intercellulari e sono dotate di capacità migratoria. Durante la EMT le cellule epiteliali perdono le giunzioni intercellulari, con conseguente distacco dalle altre cellule circostanti. Quindi le cellule che effettuano la EMT acquisiscono caratteristiche mesenchimali, necessarie per migrare lontano dal sito del tumore primario.

Sono stati identificati dei marcatori molecolari per valutare se una cellula epiteliale è andata o meno incontro al processo EMT. Il principale marcatore è la perdita della E-caderina, evento associato alla distruzione delle giunzioni cellula-cellula. L'incremento della N-caderina, della α -actina del muscolo liscio (α -SMA) e delle metalloproteasi (MMP) sono altri marcatori di mesenchimalità. Inoltre esistono dei fattori trascrizionali che si attivano durante in processo EMT come Snail, ZEB, Twist. La EMT è indotta da numerosi fattori, tra cui fattori di crescita dei recettori a tirosin chinasi, dalla via di segnalazione di Wnt, da quella di Notch, dalle MMP e dalla ipossia. Tuttavia l'induttore di EMT per eccellenza è il TGF- β 1, che svolge un ruolo fondamentale sia nei processi ontogenici che nella trasformazione neoplastica.

Ulteriori passaggi che permettono la disseminazione e la metastasi possono essere reversibili (come la transizione dal mesenchima all'epitelio, MET – *mesenchymal to epithelia transition*), e non possono essere spiegate solo con la teoria delle alterazioni genetiche irreversibili, indicando l'esistenza di una componente dinamica nella progressione del tumore umano e un ruolo regolatorio per l'ambiente tumorale.

5.1 Cellule staminali tumorali e Transizione epitelio mesenchimale

La scoperta di una popolazione di cellule di carcinoma mammario staminali che hanno subito la transizione epitelio-mesenchimale (EMT) (*Mani S.A. et al 2008*) ha aperto un nuovo fronte eccitante nello studio del cancro delle cellule staminali. Era già stato proposto che cellule staminali tumorali (*cancer stem cells*, CSC) in carcinomi vanno incontro a questo processo di trasformazione che porta all'acquisizione di un fenotipo mesenchimale migratorio, che permette loro di migrare dal tumore primario e di colonizzare siti distanti. In questi siti subiscono il processo di trasformazione inverso, la transizione mesenchimale-epiteliale (MET) formando un tumore dalle caratteristiche epiteliali come lo stesso che lo ha generato. (*Brabletz, T. et al. 2005*). Ci sono lavori sperimentali a sostegno di questa ipotesi. (*Biddle A. et al. 2011* ; *Chaffer C. L et al. 2006*). Oltre ad essere implicate nelle metastasi, le cellule staminali tumorali che hanno subito la EMT mostrano resistenza terapeutica (*Gupta, P. B. et al. 2006*) e possono pertanto costituire un serbatoio di cellule sopravvissute che è responsabile della recidiva del tumore dopo la terapia iniziale che può apparentemente essere di successo. Per queste ragioni, le cellule staminali tumorali, che sono stati sottoposti alla EMT, rimangono un punto cruciale per quella ricerca che si impegna a prevenire le recidive e le metastasi tumorali. (*Wang Z. et al. 2010*).

5.2 Gata-3 inibisce la transizione epitelio mesenchimale via E-caderina

Negli ultimi dieci anni, una notevole attenzione è stata focalizzata sul profilo di espressione differenziale di GATA3 in diversi sottotipi di tumori al seno nell'uomo. Studi su tessuti e cellule umane di cancro al seno hanno dimostrato che l'espressione di GATA3 è correlata con elevati livelli di espressione di *ER*, *E-caderina* ed è associata anche ad un decorso di lunga sopravvivenza dopo la malattia. Un esempio sono gli studi con tecniche di espressione genica differenziale, compresa l'analisi seriale dell'espressione genica (disponibile sul NSC, National Institutes of Health, sito Web) e microarray hanno dimostrato che GATA3 è altamente espresso nei tessuti ER-positivo, che descrivono la fase iniziale ancora ben differenziata dei tumori al seno con caratteristiche quindi ben diverse da quelli ER-negativi che sono associati a peggiori esiti clinici (Mehra et al. 2005 ; Sorlie T et al. 1998) per la principale caratteristica di invasività. Questi dati suggeriscono che GATA3 induce le cellule del cancro al seno con caratteristica di invasività a subire una inversione del meccanismo di transizione epitelio-mesenchimale, portando quindi alla soppressione di metastasi tumorali.

GATA3 è stato identificato soprattutto come un fattore di trascrizione che regola la differenziazione e la maturazione dei linfociti T. Si è trovato esclusivamente espresso nella fase precoce dei tumori al seno ben differenziato, non è invece espresso nelle cellule in avanzato stato di cancro invasivo. Per definire il suo ruolo Yan et al. hanno impiegato due diversi fenotipi di cellule del cancro al seno, di cui uno GATA3-positivo e quindi non invasivo (MCF-7) e l'altro GATA3-negativo ed invasivo (MDA-MB-231). L'espressione ectopica di GATA3 nelle cellule MDA-MB-231 hanno trasformato il fenotipo cellulare in quello epiteliale ed hanno ridotto l'invasività. Queste cellule hanno anche aumentato l'espressione di *E-caderina*, e diminuito i livelli di espressione di *Vimentina*, *N-caderina*, e *MMP-9*. Inoltre, nei topi xenotrapiantati cellule MDA-MB-231 che esprimono GATA3 crescono tumori primari più piccoli senza metastasi rispetto ai grandi tumori metastatici derivati dal controllo MDA-MB-231 cellule. GATA3 si è visto indurre l'espressione di *E-caderina* attraverso motivi di legame sul suo promotore. Mentre il silenziamento di GATA3 attraverso l'uso di SiRNA in cellule MCF-7 hanno innescato la trasformazione fibroblastica e quindi hanno acquisito capacità di invasione cellulare, con conseguente metastasi a distanza. Tuttavia, poco è inteso per quanto riguarda la sua attività e dei meccanismi alla base di questa espressione differenziale nei tumori. GATA3 (GATA-binding protein 3) è un membro della famiglia di fattori di trascrizione zinc finger (GATA1-GATA6), che si legano con alta affinità ai siti

consenso del DNA (T / A-GATA-A / G) (1, 2). GATA1, GATA2 e GATA3 sono principalmente espressi dalle cellule ematopoietiche, GATA4, GATA5 e GATA6 sono rilevabili nel sistema cardiovascolare e i tessuti derivati dall'endoderma, come polmone, fegato, intestino, pancreas e (*Patient RK, McGhee JD 2002*).

Studi funzionali di GATA3 nella specifica linea di cellule ematopoietiche hanno rivelato che GATA3 media la maturazione dei timociti ed è abbondantemente espresso nei linfociti T maturi (*Ranganath S. Murphy KM 2001*). Recentemente, è anche stato trovato che GATA3 gioca un ruolo essenziale nella morfogenesi embrionale del tessuto mammario. Nella ghiandola mammaria adulta, GATA3 agisce sull'epitelio duttale al fine di mantenere la differenziazione delle cellule epiteliali luminali (*Asselin Labat ML et al. 2007; Kouros Mehr H et al. 2006*). GATA3 è riconosciuto come una *key regulator* dello sviluppo di tessuto mammario e formazione della ghiandola mammaria.

5.3 Gata-3 ed il recettore per gli estrogeni ER-alpha

Una moltitudine di prove hanno dimostrato che GATA3 regola positivamente ER α legandosi sulla regione del promotore del gene, (*Kouros Mehr H et al. 2006 ; Voduc D et al. 2008, Parikh P et al. 2005*). ER α a sua volta ha la capacità di stimolare direttamente la trascrizione del gene GATA3 quando viene traslocato nel nucleo, implicando che questi due fattori si trovano in un loop di regolazione positivo reciproco. In accordo con questi dati, vi è uno studio che mostra una correlazione significativa tra i livelli elevati di GATA3 e la reattività alla terapia ormonale nei casi di cancro ER-positivo (*Parikh P et al. 2005*). Nel complesso, questi dati indicano che GATA3 emerge come un forte predittore di differenziazione del tumore al seno, di reattività agli estrogeni ed il favorevole esito clinico.

Prove crescenti ottenute sia da modelli animali tumorali sia da tumori umani, hanno stabilito l'idea che la progressione di un epitelio di derivazione tumorale in un fenotipo invasivo comporta la trasformazione in un fenotipo fibroblastico, il meccanismo è denominato transizione epitelio-mesenchimale (EMT) (*Yan W, Shao R 2006*). Durante la trasformazione, le cellule tumorali perdono le caratteristiche che includono la polarità apicale-basale tipica delle cellule epiteliali, associate alla membrana aderenti, e la proteina di adesione cellula-cellula *E-caderina*. Allo stesso tempo, acquisiscono l'espressione di *N-caderina* e *vimentina*, un marcatore delle cellule mesenchimali, e la trasformazione in un fenotipo fusiforme. Attraverso la EMT, le cellule tumorali hanno

la capacità invasiva di staccarsi dalla loro origine, invadendo lo stroma ospite, fuggendo per via vascolare e / o linfatica, ed eventualmente sopravvivere e ricrescere in una regione lontana, un processo chiamato metastasi tumorale. Un certo numero di carcinomi epiteliali, compresi seno e cancro della pelle, hanno dimostrato che la EMT è essenziale per la progressione tumorale e metastasi (*Putz E et al. 1999; Janda E. et al.2002*). Tuttavia, non è stato rigorosamente dimostrato se GATA3 può promuovere cellule tumorali invasive per il differenziamento epiteliale attraverso l'inversione di EMT. Recentemente, Kouros-Mehr et al. (*Kouros-Mehr H et al. 2008*) hanno trovato che il ripristino di GATA3 nel carcinoma mammario di animali transgenici ha innescato la differenziazione delle cellule del cancro e successivamente soppresso le metastasi.

6. Ipossia

L'ipossia è una caratteristica importante del microambiente tumorale, dovuta ad uno squilibrio nell'approvvigionamento e nel consumo di ossigeno da parte delle cellule tumorali (*Harris AL 2002*). Molti tumori solidi contengono regioni meno vascolarizzate che sono gravemente ipossiche (*Pouyssegur J et al. 2006*) e quindi possono contribuire alla progressione del cancro attivando fattori di trascrizione che promuovono la sopravvivenza cellulare, l'angiogenesi tumorale e le metastasi (*Keith B, Simon MC 2007, Pouyssegur J et al. 2006*). Inoltre l'ipossia tumorale è anche associata alla resistenza alle radiazioni e alla chemioterapia (*Mabjeesh NJ, Amir S 2007*). Non è quindi sorprendente che l'ipossia tumorale è associata ad un decorso più aggressivo della malattia e a scarsi risultati clinici (*Mabjeesh NJ, Amir S 2007*). La risposta cellulare all'ipossia è in gran parte mediata dal *fattore ipossia-inducibile* (HIF) della famiglia di fattori di trascrizione, e si traduce in cambiamenti globali trascrizionali dell'espressione genica (*Harris AL 2002 2002*). Le isoforme della famiglia HIF (HIF-1 α , 2 α -e-3 α) in condizioni normali di ossigeno (normossia; 21% O₂) sono degradati per l'azione di specifiche *prolil idrossilasi* O₂-, ferro e 2-ossoglutarato dipendenti. L'inibizione di queste *prolil idrossilasi* in condizioni di ipossia impedisce la degradazione della famiglia HIF, permettendo loro di legare e regolare i loro geni bersaglio trascrizionali. Una piccola percentuale di cellule tumorali presenta proprietà di cellule staminali (*Reya T. 2001*). Queste cellule, che sono state considerate come *tumor-initiating cells* or *cancer stem cells*, mostrano la capacità di *self-renewal* e di differenziazione *multipotenziale*, e hanno la capacità di avviare e diffondere tumori (*Mabjeesh NJ, Amir S 2007*). Dati recenti suggeriscono che queste cellule tumorali sono piuttosto comuni in alcuni tipi di cancro (*Reya T. 2001*), suggerendo che una condizione simile alla staminalità nella cellula tumorale potrebbe essere una condizione più dinamica di quanto si pensasse. È stato suggerito che l'ipossia potrebbe contribuire alla formazione di una *niche* di cellule staminali tumorali all'interno del tumore (*Mohyeldin A et al. 2010*).

6.1 Ipossia e biomarcatori di cellule staminali (CSC)

Le cellule staminali crescono in un microambiente specializzato, la *niche*, in grado di regolare l'equilibrio tra il *self-renewal*, la differenziazione e la quiescenza delle cellule staminali. Diversi fattori sono importanti all'interno della *niche*, comprese le interazioni cellulari e i fattori ambientali (*Mohyeldin A et al. 2010*). Prove recenti suggeriscono

che molte cellule staminali sono anche localizzate in aree a basso tenore di ossigeno beneficiandone, e questo pare essere a supporto della ipotesi che l'ipossia possa essere importante per il fenotipo indifferenziato di cellule staminali / precursori delle cellule (*Mohyeldin A et al. 2010 ; Keith B et al. 2007*). Bassi livelli di ossigeno stabilizzano la subunità α di HIF, *hypoxia inducible factor*, e quindi inducono l'attività trascrizionale degli eterodimeri che comprendono una subunità α e una subunità β (HIF β / ARNT) che possono legarsi alle regioni che legano il fattore di trascrizione, *hypoxia response element* HRE e attivare geni multipli, inclusi cMYC e OCT4 (*Keith B, Simon MC 2007, Pouyssegur J et al. 2006; Covello KL et al. 2006; Dang CV et al. 2005*). In alcune cellule il *signaling* di HIF è noto anche per regolare il metabolismo cellulare attraverso *up-regulation* dell'espressione di geni glicolitici e *down-regulation* dell'attività mitocondriale attraverso la trans-attivazione di PDK1, un repressore della piruvato deidrogenasi e *up-regulation* di miR-210, un soppressore di ISCU, *iron-sulfur cluster assembly protein U* (*Papandreou I et al. 2006*). In condizioni di normossia, HIF α subisce l'idrossilazione delle proline, si lega ad una E3 ubiquitina ligasi, la proteina Von Hippel-Lindau (VHL), subendo una rapida degradazione *poliubiquitinazione-dipendente* da parte del proteasoma. Anche altri mezzi di regolazione HIF sono stati descritti, tra cui la regolazione attraverso gli enzimi coinvolti nel ciclo di Krebs e microRNA (miRNA) - o regolazione istone deacetilasi-dipendente (*Cha ST et al. 2010; Zhong L. 2010*). Alcuni tipi di cancro aggressivo e cellule staminali tumorali (CSC) mostrano un *signaling* di espressione genica caratteristico delle cellule staminali embrionali . *Mathieau J et al. (2011)* mostrano che HIF induce i marcatori delle hESC, compresi gli induttori critici delle cellule staminali pluripotenti indotte (IPSC), Oct4, Sox2, NANOG, MYC, e miR-302 in cellule tumorali. Inoltre, HIF, in combinazione con gli induttori tradizionali delle cellule staminali pluripotenti indotte, IPSC, è efficiente nella generazione delle iPSC simili a colonie con peculiarità altamente cancerogene. In campioni di tumore della prostata, HIF1 α co-localizza con i marcatori delle hESC, Nanog e OCT4, e l'espressione di marcatori di cellule staminali. Inoltre, cellule primarie del glioma *nonstem* (NS) sono in grado di formare neurosfere che presentano marcatori delle hESC *up-regulated* in condizioni di ipossia, ma non in condizioni di normossia.

6.2 Ipossia e miR-302

Mathieau J et al. (2011) hanno rilevato una convergenza nella *miRNA signature* tra linee cellulari tumorali ipossiche e linee di hESC indifferenziate. La maggior parte delle hESC esprimono un set di miRNA specifico (Stadler B et al. 2010 ; Qi J et al. 2010), tra cui il miR-302a-b, miR-106a-b, miR-92, miR-372, miR-19b, miR-130a, miR-30e-5p, miR-195. (Figura). Questi stessi miRNA sono stati trovati significativamente *up-regulated* in linee di cellule tumorali coltivate a bassi livelli di

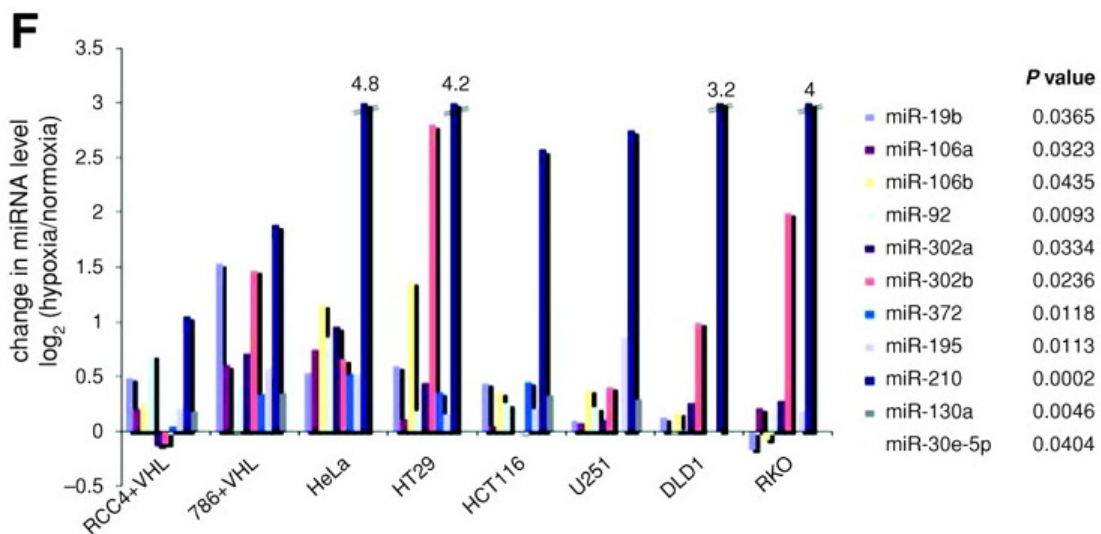
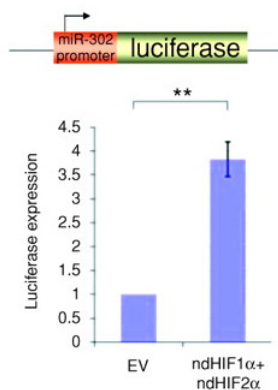


Figura 12. L'ipossia induce l'espressione di ESCs markers in diverse linee di cellule tumorali. MiRNA specifici delle cellule staminali hESC sono uperegulated dopo trattamento in ipossia (24h in 2% O₂) in diverse linee di cellule tumorali (qRT-PCR analysis). Il P-value è stato calcolato usando il t-test per misurare la differenza tra i livelli di miRNA nelle due diverse condizioni, ipossia e normossia.

ossigeno ad indicare che linee di cellule tumorali si portano verso un *miRNA-profiling*



simile a quello delle cellule staminali quando vengono esposte a ipossia. L'ipossia induce la up-regulation del miR-302b e il miR-106a in cellule ME180, ed è stata ulteriormente validata da ulteriori qRT-PCR. Mathieau J et al. hanno inoltre testato se il promotore del miR-302 fosse sensibile alle HIF utilizzando ndHIF1 α e ndHIF2 α (Yan Q et al. 2007) e un costrutto reporter del promotore miR-302 legato alla luciferasi. L'attività della luciferasi è stata

sovraregolata in presenza di ndHIF1 α e ndHIF2 α nella cellule *HeLa*, dimostrando che il miR-302 è promotore sensibile alla espressione di ndHIF (Figura).

Come riportato precedentemente, l'espressione del miR-210 è indotta in risposta al trattamento in ipossia (*Chan SY et al. 2010* ; *Yan Q et al. 2007*). Il miR-210 ha dimostrato di aumentare l'attività di MYC inibendo MNT, che è il naturale antagonista di MYC (*Zhang Z. et al. 2009*), e per regolare il metabolismo sopprimendo la ISCU (*Zhang Z. et al. 2009*). Pertanto, la upregulation del miR-210 HIF-dipendente potrebbe anche contribuire alla determinazione del fenotipo staminale in queste cellule tumorali trattate in condizioni di ipossia.

6.3 Ipossia e transizione epitelio-mesenchimale

Uno dei numerosi fattori cellulari su cui incide l'ipossia è Snail, il principale regolatore della transizione epitelio-mesenchimale (EMT). Si è visto che Snail è implicato nei processi chiave tumorali biologici come l'invasione e le metastasi.

La transizione epitelio-mesenchimale (EMT) è un processo biologico che definisce la progressione da un fenotipo epiteliale polarizzato ad un fenotipo mesenchimale, che si distingue per caratteristiche simili ai fibroblasti (*Thiery e Sleeman, 2006*). La transizione epitelio-mesenchimale è caratterizzata da un cambiamento delle proteine specifiche del tipo cellulare e conduce alla facilitazione della motilità cellulare. La transizione epitelio-mesenchimale è considerato un processo transitorio e reversibile e rappresenta solo uno dei diversi passaggi necessari per la progressione del tumore con l'invasione e la diffusione metastatica (Christiansen e Rajasekaran, 2006). Come recensito da Christiansen et al ci sono studi che descrivono un fenotipo parziale o una EMT incompleta dei carcinomi avanzati, che pur mostrando alcune caratteristiche mesenchimali, hanno ancora una riserva di caratteristiche di cellule epiteliali ben differenziate (Christiansen e Rajasekaran, 2006). La disposizione architetturale di un tessuto epiteliale è caratterizzata da una fitta rete di strutture giunzionali come le *giunzioni strette*, e *gap adherens* e i *desmosomi*. Le *caderine* sono importanti per la stabilizzazione di queste strutture, e, in particolare, *E-caderina* (Materia e Balda, 2003). Una caratteristica importante di EMT è la perdita di E-caderina, con conseguente destabilizzazione dei contatti cellula-cellula e il distacco delle cellule dal suo ambiente. La repressione della trascrizione genica della E-caderina è il risultato della sovraespressione di diversi repressori che inducono la EMT, come il fattore di trascrizione zinc-finger *Slug* (Hajra et al, 2002) e *Snail* (Barrallo- Gimeno e Nieto, 2005). E' stato riportato che la sovraespressione di *Snail* è un induttore sufficiente della

EMT, oltre ad essere un predittore del fenotipo di tumore aggressivo (Cano et al, 2000). Nel carcinoma mammario l'aumento di espressione di *Snail* è stata associata ai linfonodi, all' invasività e al potenziale metastatico (Cheng et al, 2001; Blanco et al, 2002), e anche alla ridotta sopravvivenza libera da recidiva (Moody et al, 2005). Kurrey ed altri (2005) hanno riportato che l'espressione ectopica di *Snail* o *Slug* comporta l'induzione della EMT in una linea cellulare di carcinoma ovarico, con aumento di proprietà quali la motilità e l' invasività, la perdita di espressione di marcatori epiteliali e l'aumentata espressione di vimentina. Il silenziamento stabile di *Snail* induce alla transizione mesenchimale-epiteliale completa in MDCK-*Snail* cellule, e la riduzione della crescita tumorale in vivo di due linee indipendenti (Olmeda et al, 2007). Oltre all'importanza della cellula tumorale stessa, è ben stabilito che il microambiente tumorale gioca un ruolo cruciale nella carcinogenesi (Liotta e Kohn, 2001). L'ipossia è prevalentemente causata dalla formazione anomala della massa tumorale in rapida crescita, ed il risultato netto è la formazione di aree eterogenee di bassa pressione di ossigeno (Vaupel et al, 2002). L' adattamento della cellula tumorale permette la sopravvivenza e provoca l'eterogeneità e la selezione di cloni resistenti, contribuendo a un fenotipo più maligno (Semenza, 2003). La risposta ipossica mediata dal fattore di trascrizione hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) attiva geni bersaglio coinvolti in una serie di diversi processi cellulari, quali la proliferazione, l'angiogenesi e la EMT, tutti collegati alla progressione maligna (Semenza, 2002; Imai et al, 2003; Yang e Wu, 2008). L' upregulation della espressione dell' mRNA di *Snail* in condizioni di ipossia, con concomitante down-regulation di E-caderina, è stato riportato in linee cellulari di carcinoma ovarico (Imai et al, 2003; Kurrey et al, 2005), ed è stato anche dimostrato che l'invasività delle linee di cellule di cancro ovarico ipossiche aumenta (Imai et al, 2003). Inoltre, *Lester et al* (2007) hanno riportato che l'esposizione della linea cellulare del cancro della mammella MDA-MB-468 all'1% ossigeno comporta un aumento dell'espressione di vimentina, una diminuzione dei livelli di espressione di E-caderina e la traslocazione nucleare della proteina *Snail*. In particolare, queste cellule hanno adottato una simile morfologia mesenchimale, aumentando la loro capacità migratoria e sono stati in grado di diffondere in vivo. *K Lundgren et al. 2009* nel loro studio, hanno fornito una delucidazione sulla regolazione della EMT mediante l'induzione di *Snail*, e sul rapporto tra EMT e ipossia, in un pannello di linee cellulari di tumore mammario, utilizzando un valido anticorpo specifico di *Snail*. Hanno esposto quattro linee cellulari di cancro al seno al 0,1% di ossigeno ed hanno poi monitorato l'espressione di

marcatori specifici della EMT. L'esposizione allo 0,1% di ossigeno hanno portato l'espressione della proteina *Snail* ad elevati livelli con corrispondenti variazioni nei livelli di espressione di vimentina ed E-caderina. Hanno anche osservato un aumento delle capacità migratorie nelle cellule MDA-MB-468. Inoltre la sovraespressione di *Snail* porta ad un aumento della motilità nelle cellule MCF-7, T-47D e MDA-MB-231, mentre il silenziamento della proteina riduzione della tendenza migratoria nelle stesse linee cellulari. L'espressione di *Snail* nucleare è associata a tumori ad alto grado e tasso di proliferazione, ma non con recidiva. È interessante notare che *Snail* è stata associato ad alterata risposta tamoxifene ($p = 0,048$). Questi risultati dimostrano che l'ipossia induce l'espressione di *Snail*, ma in genere non è un fenotipo migratorio, suggerendo che le cellule ipossiche sono solo in parte spinti verso EMT.

.6.4 Ipossia e reprogramming

La pluripotenza è caratterizzata da fattori di trascrizione specifici come OCT4, NANOG e Sox2, ma anche è anche associata a microRNA (miR). E' stato visto che cellule somatiche possono essere riprogrammate con l'espressione forzata di questi fattori in *cellule staminali pluripotenti indotte* (iPSCs) presentando caratteristiche simili alle cellule staminali embrionali (ESC). Tuttavia, le attuali strategie di riprogrammazione sono comunemente basate sul *viral delivery* dei fattori associati alla pluripotenza, intaccando l'integrità del genoma e impedendo quindi l'uso di tali cellule in qualsiasi applicazione clinica. Nel tentativo di stabilire strategie nonintegrating non virali di riprogrammazione, Foja et al. hanno studiato l'influenza dell'ipossia sull'espressione dei fattori associati alla pluripotenza e il cluster del miR-302 in cellule mesenchimali primarie e i stromali immortalate (MSC). La combinazione di ipossia e di trattamenti con il fattore di crescita dei fibroblasti 2 (FGF2) hanno portato alla induzione di OCT4 e NANOG in una linea cellulare immortalizzata L87 e MSC primaria, con raddoppio dei livelli di senescenza aumentata e diminuita. La cosa più importante, il cluster del miR-302 endogeno specifico delle ECS è stato indotto in ipossia e dopo il trattamento con FGF2. L'ipossia ha anche incentivato la riprogrammazione delle cellule staminali mesenchimali attraverso l'espressione episomale di fattori pluripotenza. Il lavoro di Foja dimostra che l'ipossia in combinazione con FGF2 facilita una riprogrammazione efficiente nelle cellule staminali mesenchimali. (Foja et al. 2013)

7. Le mammosfere

Nel 2003 *Dontu e colleghi* hanno sviluppato una nuova tecnica che ha permesso, per la prima volta, di coltivare cellule staminali mammarie in un sistema di coltura tridimensionale per ottenere aggregati sferici chiamati “mammosfere”. È stato dimostrato che le mammosfere derivano da una singola cellula capace di autorigenerarsi e comprendono precursori indifferenziati capaci di differenziarsi nelle tre linee cellulari che costituiscono l'epitelio mammario (luminale, mioepiteliale e alveolare) (*Dontu et al., 2003*). Le mammosfere sono altamente arricchite di cellule indifferenziate, come dimostrato dalla capacità delle singole cellule, isolate dalle mammosfere, di generare colonie di diversi tipi cellulari (multilineage) se coltivate in condizioni di differenziazione. La coltura delle mammosfere è stata ampiamente utilizzata per incrementare il numero di cellule staminali epiteliali mammarie e cellule staminali tumorali (CSC).

7.1 La coltura di mammosfere prolungata induce la transizione epitelio-mesenchimale (EMT).

La transizione epitelio-mesenchimale (EMT) induce anche caratteristiche di cellule staminali in cellule mammarie normali e trasformate. Gutilla et al. 2012 hanno esaminato dove le condizioni di coltura delle mammosfere di per sé inducono la EMT nelle cellule della linea epiteliale MCF-7 di cancro al seno. Le cellule MCF-7 sono state coltivate come mammosfere per 5 settimane, con dispersione e reseeding alla fine di ogni settimana. Questa coltura di mammosfere ha indotto una completa EMT già alla terza settimana. Queste cellule poste nelle normali condizioni di coltura aderente hanno generato una popolazione cellulare (denominato MCF-7 (M) che presenta un caratteristico fenotipo mesenchimale e simile alle CSC CD44+/CD24-. La EMT era accompagnato da uno stabile, marcato aumento di fattori di trascrizione EMT-associati e marcatori mesenchimali, e una diminuzione dei marcatori epiteliali e del recettore α (ER α). Le cellule MCF-7 (M) mostravano un aumento della motilità, della proliferazione e della chemioresistenza in vitro, e hanno prodotto grandi tumori in topi immunodeficienti con o senza supplementazione di estrogeni. Analisi di MiRNA ha mostrato la soppressione del miR-200c, miR-203 e miR-205 ed un incremento dei livelli di espressione del miR-222 e miR-221. Hairpin RNA antisense inibitore di targeting miR-221 portato a ri-espressione di ER α in MCF-7 (M) delle cellule. Questo studio fornisce il primo esempio di condizioni di coltura di mammosfere che inducono la

EMT e la conseguente regolazione di microRNA che hanno come bersaglio il recettore per gli estrogeni, ER α .

7.2 Espressione di Sox2 nelle cellule tumorali di mammella e la sua attivazione nelle CSC

A causa del ruolo rilevante di Sox2 nel mantenimento della pluripotenza, O'Leis et al. 2012 hanno dimostrato che l'espressione di Sox2 sarebbe legata alla presenza di CSC. Per validare la loro ipotesi, hanno mantenuto le cellule in coltura sottoforma di mammosfere considerandole un saggio in vitro della capacità che avrebbero le cellule staminali di iniziare la tumorigenesi ed hanno misurato i livelli di espressione di Sox2. In queste condizioni le CSC sono in grado di mantenere proprietà simil-staminali quali l'iniziazione del tumore, il self-renewal e il potenziale di differenziazione limitata (Dontu et al, 2003;. Ponti et al, 2005). Il risultato ottenuto dimostra che quando le cellule sono coltivate in condizioni tali che le proprietà staminali vengono rilevate, Sox2 è espresso. L'esistenza di una discreta popolazione di iniziazione del tumore in linee cellulari di carcinoma è stato già descritto (Patrawala et al, 2005;. Engelmann et al, 2008;. Fillmore e Kuperwasser, 2008).

I microRNA, chiamati anche miRNA o miR, sono brevi molecole di acido ribonucleico di 19-24 nucleotidi che svolgono un importante ruolo regolativo nell'espressione di proteine cellulari tramite *silenzamento genico post-trascrizionale*. I geni dei miRNA sono per lo più localizzati in introni di geni codificanti per proteine o sono trascritti in RNA policistronici. Nonostante la loro identificazione e descrizione sia relativamente recente, ai microRNA sono state attribuite funzioni che coinvolgono pressochè tutti i processi cellulari fisiologici e patologici.

La nostra attività di ricerca ha riguardato lo studio di una famiglia di microRNA, il miR-302. Degli oltre 700 miRNA identificati, il miR-302 sembra essere quello maggiormente espresso in cellule embrionali staminali (-ES-) ed è uno dei microRNA con la più alta specificità di espressione. Abbiamo svolto uno studio molecolare del miR-302 sui profili di espressione da cellule staminali embrionali umane (hESC) e da hESC in differenziamento. Lo scopo di questo primo esperimento era quello di valutare la variazione dell'espressione del miR-302 e di altri miRNA, nei diversi tipi cellulari e verificare se esisteva una correlazione tra i diversi profili di espressione e lo stato cellulare.

Abbiamo quindi clonato una regione conservata a monte del cluster genico del miR-302 in un plasmide reporter GFP. Nelle ESC abbiamo verificato se tale sequenza conservata, fosse effettivamente il promotore del cluster. Abbiamo quindi osservato le modificazioni della sua attività, durante il differenziamento cellulare. Successivamente abbiamo clonato in un vettore di espressione costitutiva il cluster. I costrutti *pEGFPc1-miR302* positivi ottenuti sono stati trasfettati in H1299 cells e HEK293 cells.

Le cellule staminali embrionali umane (hESCs) sono derivate degli epiblasti che fanno parte della Massa Cellulare Interna (ICM) di una blastocisti o di embrioni nella prima fase di morula. Un'ibridazione in situ su embrioni di topo ha rivelato che il miR-302 è abbondantemente espresso nella regione embrionale/epiblasto dell'embrione durante la

gastrulazione ed è escluso dalla struttura extraembrionale. Si pensa che una piccola porzione di cellule tumorali in alcuni tumori possono avere proprietà di cellule staminali. L'ipotesi delle CSC (Cancer Stem Cells) fornisce una spiegazione per la refrattarietà alla terapia e la capacità latente di alcuni tumori. Nel nostro laboratorio sono stati scoperti una serie di miRNA che hanno un ruolo critico nel cancro e perciò la nostra attività di ricerca si è svolta successivamente indagando i loro livelli di espressione in tessuti normali e nelle controparti tumorali. Abbiamo esaminato quindi l'espressione del mir-302 in campioni di carcinoma duttale in situ e campioni di carcinoma infiltrante di mammella. Da indagini di ibridazione in situ, è emerso che il Mir-302 è presente nel carcinoma duttale infiltrante, ma non in cellule di tessuto normale. Inoltre tumori primari con metastasi linfonodale hanno un eccesso di cellule tumorali che esprimono il mir-302. Partendo da questa osservazione, abbiamo cercato di comprendere i meccanismi che portano alla espressione del cluster. Abbiamo osservato che linee di cellule tumorali di cancro al seno trattate in condizioni di ipossia esprimono il miR-302b, mentre la controparte in normossia non la esprime.

Essendo quindi il miR-302 legato a metastasi e soprattutto alla minore sopravvivenza dell'individuo, in base allo screening svolto sui tessuti di pazienti, abbiamo eseguito uno studio funzionale del miR-302b, andando a studiare il targeting sul recettore degli estrogeni ER-alpha in linee di cellule epiteliali che lo esprimono. La validazione del target ci ha portato a fare diverse ipotesi sul ruolo che potesse avere l'espressione del miR-302 sulla transizione epitelio mesenchimale EMT e la controparte, MET.

Da questo studio è seguita la scelta di generare un topo Knock in, in cui l'espressione del miR-302 è marcata da un gene reporter, ZsGreen, che porterà ad una serie di studi in vivo per i prossimi anni.

1. Analisi dei miRNA espressi in cellule ESC e differenziate

1.1 Lo sbilanciamento tra miR-302 e miR-203 definisce le cellule pluripotenti.

Abbiamo studiato diversi miRNA nelle ESC umane durante il differenziamento. Utilizzando microarrays per miRNA su ESC pluripotenti, nei corpi embrioidi (EB) al settimo e quattordicesimo giorno del differenziamento, nei trofoblasti e nei monostrati spontaneamente differenzianti, abbiamo identificato 35 miRNA. I tipi cellulari analizzati sono stati completamente separati, dimostrando che il profilo di espressione dei miRNA era specifico per ogni linea cellulare derivata dalle ESC. I risultati dei microarrays sono stati validati ed inoltre sono state studiate le iPSCs e l'endoderma definitivo tramite una RT-PCR specifica per i miRNA.

Dei miRNA studiati il miR-203 è risultato non essere presente nelle ESC e nelle iPSC, è invece espresso in tutte le linee cellulari derivanti dalle ESC in differenziamento, inclusi gli EB. Il miR-203 è considerato un repressore della staminalità (*Yi R, Poy MN et al. 2008*). I membri della famiglia del miR-302 sono risultati essere altamente espressi nelle ESC nelle iPSC, e deregolati nei monostrati, nei trofoblasti e nei corpi embrioidi al quattordicesimo giorno.

Abbiamo osservato che elevati livelli di miR-302 non sono sufficienti per la pluripotenza, dato che in molti tipi cellulari derivati dalle ESC il miR-302 è risultato essere espresso (on). Potremmo pertanto asserire che lo status di pluripotenza di ESC/iPSC è definito dal rapporto tra il miR-302s (on) e il miR-203 (off). Questo implica che entrambi i miRNA devono essere appropriatamente regolati: le cellule pluripotenti ESC e iPSC hanno mostrato avere un rapporto miR-302/203 quasi 20 volte maggiore che in tutti i tipi cellulari valutati in differenziamento

Gli altri miRNA hanno mostrato avere patterns specifici. Si sospettava che l'azione del miR-302 fosse quella di dare inizio alla degradazione dei suoi mRNA bersaglio nelle ESC. È stato usato T-REX (*Volinia S et al.*) per valutare la diretta degradazione degli mRNA da parte dei miRNA in 33 campioni di ESC umane. I membri della famiglia del miR-302 sono risultati i microRNA più attivi. I bersagli del miR-302 sono stati confermati essere repressi in ESC di topo e nelle iPSC (GEO dataset GSE14012). I miR-302 and miR-372 non sono stati trovati attivi nelle cellule staminali che presentano già un grado di differenziazione, come per esempio, le cellule staminali neuronali (GSE14299). Il miR-302c nelle cellule pluripotenti reprime proteine nucleari coinvolte nella differenziazione, nella regolazione negativa della trascrizione, nello sviluppo

multi-cellulare, nella formazione dei vasi sanguigni, nello sviluppo del sistema nervoso, nel ciclo cellulare, nella emopoiesi, nello sviluppo muscolare .

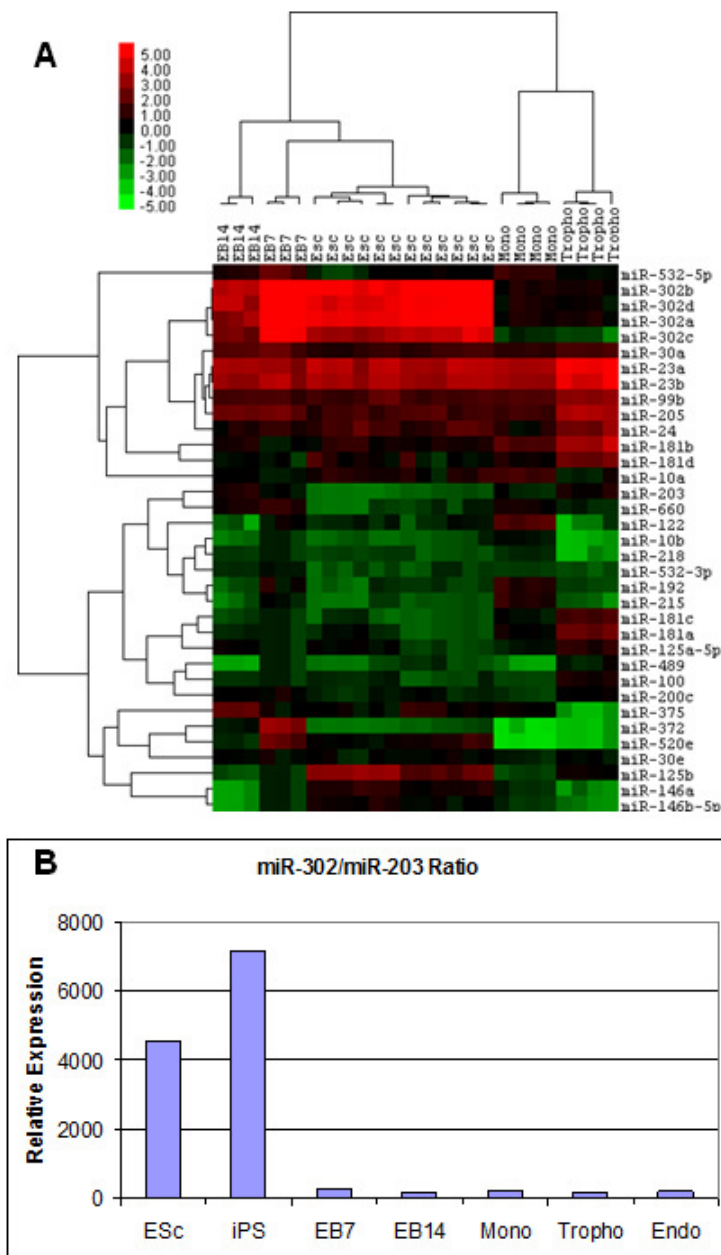


Figura 1.
Espressione dei miRNA nelle cellule staminali embrionali umane.

A) L'albero è stato costruito con Cluster e metrica di correlazione, I valori sono centrati sulla mediana. L'ibridizzazione al biochip di MicroRNA e l'analisi sono state eseguite come riportato Liu CG, Calin GA, Volinia S, Croce CM. MicroRNA expression profiling using microarrays. Nature protocols. 2008;3(4):563-578.

B) Real Time PCR per la detenzione di microRNA maturo in cellule staminali pluripotenti tramite l'uso di stem loop assay (ABI). Le singole barre indicano l'espressione relativa (normalizzata su RNU44) per ognuno dei microRNAs valutati. I valori riportati sono la media di 3 esperimenti indipendenti.

Leggenda: ESc: cellule staminali embrionali; iPS, cellule staminali pluripotenti indotte; EB7/EB14, corpi embrioidi (7 and 14 days, rispettivamente); Mono, monostrato differenziatosi spontaneamente; Tropho, trophoblasti; Endo, endoderma definitivo.

Sono stati eseguiti dei profili di espressione anche su diversi tipi di tessuti umani sani, come mostrato in figura 15 per indagare il livello di espressione dei miRNA della famiglia del miR-302 anche nelle cellule adulte, utilizzando come controllo le cellule staminali embrionali, in cui è stato, da precedente analisi, riscontrata l'espressione di tali miRNA.

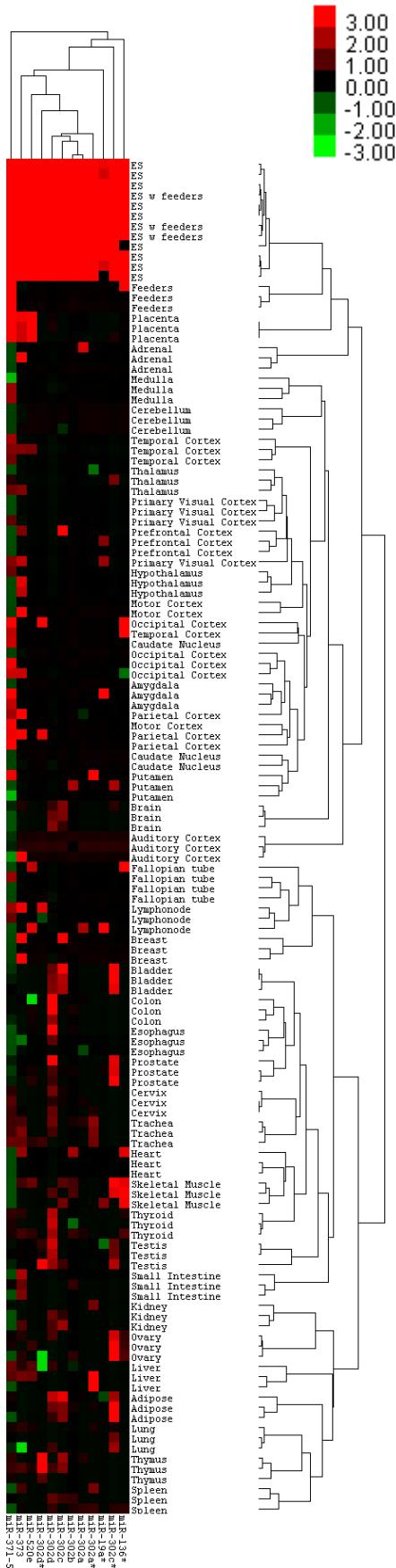


Figura 2.

Profilo di espressione di diversi miRNA nelle ESC e in diversi tessuti umani.

I membri della famiglia del miR-302 risultano essere significativamente espressi solo nelle ESC pluripotenti. Infatti lo spot visibile in singoli campioni di alcuni tessuti non è statisticamente valido, ma è considerato un errore.

1.2. Studio della sequenza promotrice del miR-302 di topo

La sequenza del promotore murino del miR-302 di 517 bp, è stata amplificata e isolata con l'utilizzo dei seguenti primers disegnati utilizzando il programma PRIMER 3 (http://www-genome.wi.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi):

forward 5'AAAGATTTCTCAAATTGCTTCCAA 3'

reverse 5'CGCCGACTTTAGACCACTTG 3'

E' stato effettuato il clonaggio molecolare inserendo la regione promotrice nel MCS del vettore *pZsGreen1-1* (Clontech), un vettore adatto per la trasfezione in cellule staminali, privo della sequenza promotrice e contenente il gene reporter *ZsGreen1* a valle del sito di clonaggio multiplo. Verificato il clonaggio, è stata eseguita la trasfezione con lipofectamina in cellule staminali embrionali murine. I cloni sono stati successivamente selezionati mediante trattamento con l'antibiotico G418, per cui il vettore conferisce resistenza. Ogni colonia selezionata è stata poi piccata e messa a crescere, una parte su gelatina, che conduce al differenziamento cellulare e l'altra su una matrice chiamata *feeders* costituita da fibroblasti di topo, che contribuiscono al mantenimento della staminalità. Dalle immagini al tempo D1 le cellule in crescita sono numerose su entrambi i terreni, ma sembrano essere un numero maggiore su gelatina. Invece nelle immagini al tempo D10

si osserva una grande differenza tra le cellule dei due terreni. Mentre su *feeders* le

cellule continuano a crescere senza troppe variazioni, su gelatina si osserva una forte riduzione della fluorescenza verde rispetto alle cellule in D1. Le poche cellule rimaste sono concentrate in alcuni punti, mentre su gelatina si osserva una crescita diffusa di cellule non fluorescenti e differenziate.

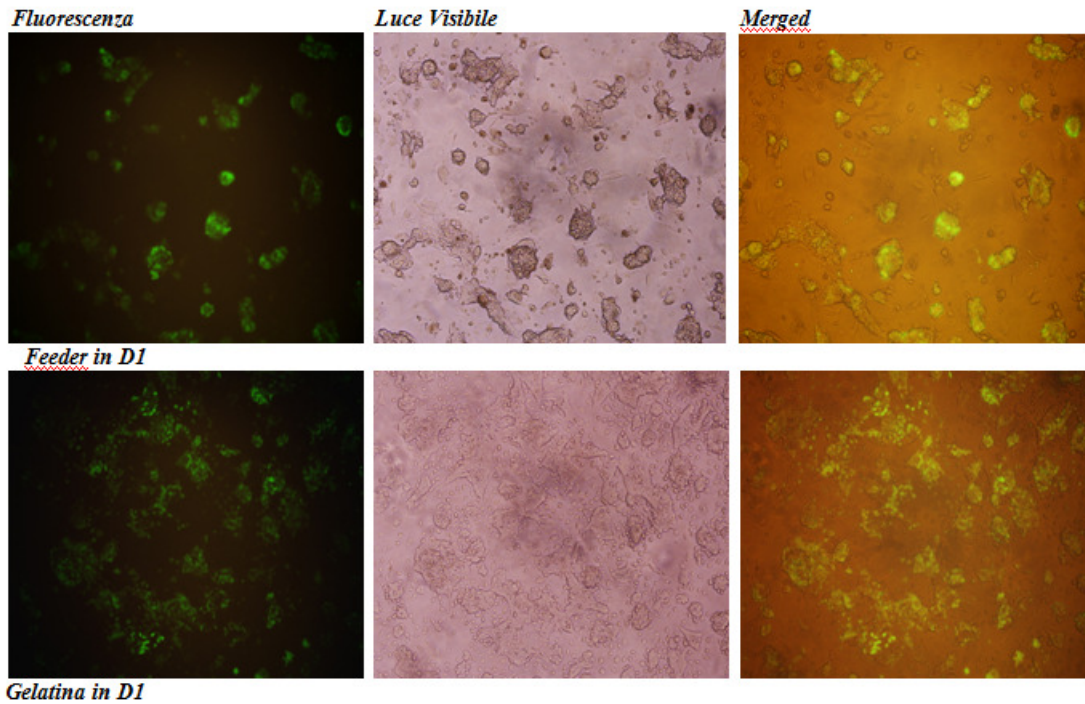
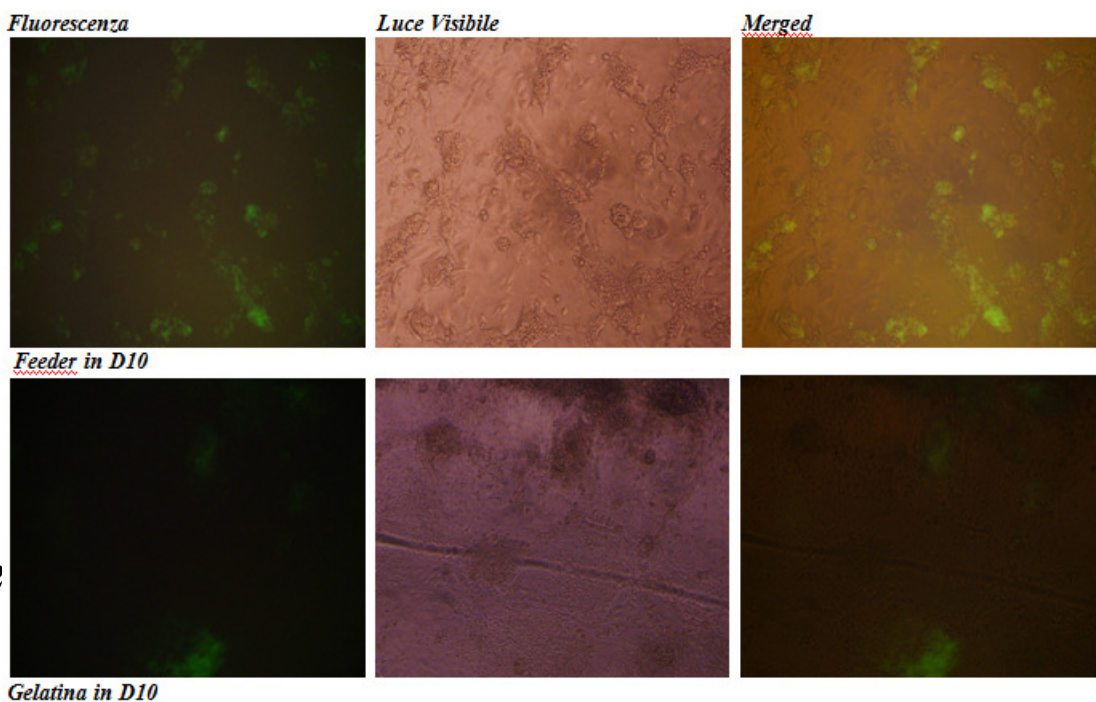


Figura 3.
Crescita di cloni di cellule staminali embrionali murine esprimenti pZsGreen1-1 su gelatina e su feeders

Le immagini mostrano frammenti dello stesso clone selezionato, un giorno dopo che questo è stato piccato sul terreno di gelatina e sul feeders. La luce fluorescente mostra solo le cellule contenenti il vettore ricombinante, mentre con luce bianca si possono vedere anche le cellule che non esprimono il vettore e quindi non possono essere fluorescenti. La merged è una sovrapposizione tra l'immagine a fluorescenza e quella a luce bianca. Le immagini mostrano frammenti dello stesso clone selezionato 10 giorni dopo che questo è stato piccato sul terreno di gelatina e sul feeders.



2

2. *Espressione del miR302 nei tessuti tumorali*

Una elevata espressione del miR-302 è stata osservata in due tumori rari collegati a cellule germinali (*Clevers H.*), quali il *seminoma* (un cancro testicolare che si ritiene sia generato dall'epitelio germinale dei tubuli seminiferi) e *teratocarcinoma* (che origina dalle cellule embrionali *multipotenti*) . In base a questa evidenza, abbiamo deciso di studiare l'espressione del miR-302 nei tessuti tumorali. Abbiamo esaminato 771 campioni di cancro e 3005 campioni sani umani della nostra banca dati di espressione dei miRNA nei tumori solidi. I tessuti tumorali hanno mostrato un eccesso di campioni positivi per il miR-302 (χ quadro, Yates 2x2 p-value <0.001), anche se nessuno di essi presentava livelli di espressione paragonabili a quelli presenti nelle ESC, iPSCs, seminoma, o teratocarcinoma. Questa osservazione si presentava potenzialmente interessante e le sono state attribuite due alternative spiegazioni: o solo una piccola percentuale di cellule tumorali si presenta con elevati livelli di miR-302 o è presente una diffusa, ma basale, attivazione del miR-302 in tutte le cellule maligne.

Per testare le due ipotesi, abbiamo eseguito ibridazioni in situ (ISH) su 41 campioni di tumori al seno. Questi campioni sono stati ottenuti da donne con un follow-up minimo di cinque anni dopo la diagnosi iniziale. La metà delle donne non presentava evidenza di metastasi al momento della diagnosi, mentre la restante parte aveva riscontrato metastasi linfonodali; tutte le donne avevano subito la resezione del nodo linfatico. ISH è stata effettuata su campioni di cui non si conoscevano le informazioni cliniche. Abbiamo standardizzato lo *screen* su embrioni umani e murini, e su un controllo negativo: un tessuto di seno adulto umano. L'embrione umano a sei settimane mostrava sporadici cellule positive al miR-302a/b/c localizzate su due regioni distinte: la matrice germinale ed il mesenchima primitivo. Gli embrioni di topo hanno mostrato una distribuzione equivalente a quella nell'uomo. Esperimenti di co-localizzazione con CD44 hanno dimostrato che le cellule di embrioni esprimenti il miR-302 sono risultati positivi anche per il marcatore CD44 sulle cellule staminali mesenchimali. D'altra parte invece, nel seno normale, non è stato rilevato alcun segnale positivo al miR 302. ISH sui tumori al seno hanno mostrato che circa il 50% dei casi contenevano cellule positive al miR-302a/b/c. Esperimenti di co-localizzazione hanno dimostrato che molte cellule tumorali erano sezioni positive al CD44, di cui solo una parte erano positive anche per il miR-302 (circa 10:1). Inversamente, tutte le cellule che esprimevano il miR-302 sono risultate positive per il CD44. Inoltre, le cellule miR-302 positive avevano le

caratteristiche citologiche di cellule tumorali ed esprimevano la citocheratina AE 1/3, confermando che erano cellule epiteliali maligne .

Successivamente abbiamo cercato di correlare i dati clinici e quelli di espressione. I risultati ISH hanno dimostrato che un maggior numero di cellule positive al miR-302 erano presenti in BC (*breast cancer*) primario con metastasi a distanza ($p = 0,002$). D'altro canto, i già bassi livelli del miR-203 nel tumore primario si trovano ulteriormente diminuiti nelle metastasi a distanza (test t, $p\text{-value} < 0.001$). Tuttavia, dato che il rapporto coordinato tra il miR-302/miR-203 è un discriminante delle cellule staminali pluripotenti da tutti gli altri tipi di cellule, abbiamo deciso di misurare il \log_2 del rapporto miR-302/miR-203 in campioni di BC durante la progressione metastatica. Lo squilibrio tra miR-302/miR-203 (come definito dal rapporto \log_2 di cui sopra) era effettivamente presente nei linfonodi metastatici e nelle metastasi distanti. Questi due tipi di metastasi presentavano uno squilibrio nel rapporto tra i due miRNA maggiore rispetto alla loro controparte di tumori primari (valori $p < 0,001$). Abbiamo inoltre valutato l'associazione tra la sopravvivenza complessiva (OS) e il mi302 in 96 pazienti IDC (Invasive Ductal Carcinoma). Per questo gruppo, il follow-up medio dei pazienti vivi in riferimento all' ultima visita era di 75 mesi. I pazienti con tumori primari positivi per il miR 302 avevano significativamente una sopravvivenza complessiva più breve ($P = 0.03$). La stima del tasso di sopravvivenza a 5 anni era del 76% per i pazienti con l'espressione del miR302 negativo e il 57% per quelli con una espressione positiva. In una prima analisi svolta in relazione alla presenza di fattori, quali il recettore dell'estrogeno, il recettore del progesterone o HER2/neu ha rivelato che il miR302 è indipendente, quindi il legame alla sopravvivenza complessiva rimane univoquo.

3. Espressione del miR-302 in vitro: indagini preliminari

ISH sui tumori al seno hanno mostrato che circa il 50% dei casi contenevano cellule positive al miR-302a/b/c. Inoltre, le cellule miR-302 positive avevano le caratteristiche citologiche di cellule tumorali ed esprimevano la citocheratina AE 1/3, confermando che erano cellule epiteliali maligne .

Da questa osservazione, abbiamo cercato di descrivere e confermare i dati clinici attraverso lo studio biomolecolare. Abbiamo pertanto eseguito una RT-PCR per misurare l'espressione del miR-302 nelle diverse linee di cellule tumorali di mammella (MDA-MB-436; MDA-MB-231; MDA-MB-453; MCF7) ed una linea epiteliale non

tumorale di controllo (MCF10). Da una prima indagine svolta, abbiamo constatato che in queste linee cellulari non sono presenti livelli di espressione del miR-302a/b. Lo stesso tipo di indagine è stato poi successivamente eseguito andando a separare, attraverso analisi di citometria a flusso (FACS), il fenotipo CD44+CD24- delle linee cellulari tumorali, dalla restante parte, sostenuta dai risultati raccolti da esperimenti di co-localizzazione, in cui si è visto che tutte le cellule che esprimevano il miR-302 sono risultate positive per il CD44.

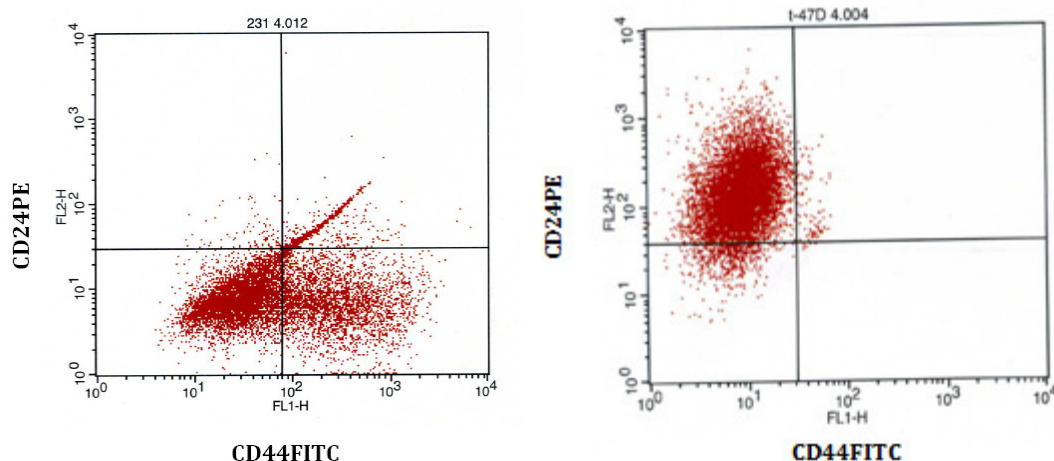


Figura 4.
Analisi di citometria a flusso per la identificazione della sub-popolazione CD44+CD24- in T47D e MDA-MB-231, linee di cellule tumorali di mammella.
 Le cellule in R1 corrispondono al fenotipo CD44+CD24-.

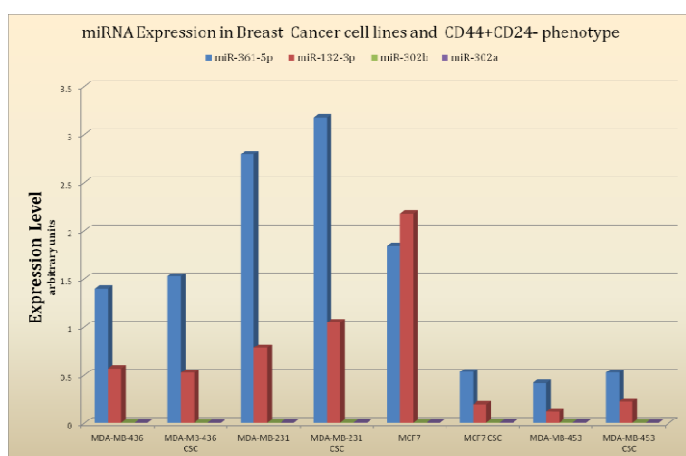


Figura 5.
Espressione del miR302 a/b in linee di cellule tumorali e non di mammella.
 La RT-PCR è stata eseguita su campioni di RNA estratti da cellule separate tramite citometria a flusso (FACS) in base al fenotipo CD44+CD24- e alla restante parte.

Oltre all'espressione del miR-302a/b è stata misurata l'espressione di altri miRNA, di cui miR-361-5p e il miR-132-3p in figura, al fine di avere dei controlli positivi. I miRNA elencati mostrano nei tessuti tumorali di mammella, bassi livelli di espressione e presentano una certa stabilità. (Volinia et al). I dati sono stati normalizzati con il miR-128a .

Anche in questo caso, i risultati ottenuti riguardanti i livelli di espressione del miR-302 sono risultati negativi così come mostrato nel grafico in figura.

4. Espressione del miR302b in condizioni di ipossia

Il lavoro di *Mathieau J et al.* (2011) mostra una convergenza nella *signature* dei *miRNA* tra linee cellulari tumorali ipossiche e linee di hESC indifferenziate. L'ipossia, attraverso HIF, *hypoxia-inducibile factor*, può indurre un programma trascrizionale simile alle cellule staminali embrionali umane, hESC. E' stata osservata la ri-espressione degli induttori delle cellule staminali pluripotenti (iPSC), *Oct4*, *Nanog*, *Sox2*, *Klf4*, *cMYC* ed il *microRNA-302* in 11 linee cellulari tumorali (prostata, cervello, rene, collo utero, polmone, i tumori del colon, del fegato e della mammella).

L'ipossia induce la *up-regulation* del miR-302b e il miR-106a in cellule ME180 (*invasive squamous cell carcinom*). Questo dato è stato validato sia da ulteriori qRT-PCR, sia da saggio di luciferasi. *Mathieau J et al.* hanno testato nelle cellule *HeLa* se il promotore del miR-302 fosse sensibile alle HIF utilizzando ndHIF1 α e ndHIF2 α (*Yan Q et al. 2007*) e un costrutto reporter del promotore miR-302 legato alla luciferasi. L'attività della luciferasi è stata sovraregolata in presenza di ndHIF1 α e ndHIF2 α , dimostrando che il promotore del miR-302 è sensibile alla espressione di ndHIF.

Bassi livelli di ossigeno stabilizzano la subunità α di HIF, quindi inducono l'attività trascrizionale degli eterodimeri costituiti da una subunità α e una subunità β (HIF β / ARNT) a legarsi alle regioni HRE, *hypoxia response element*,. In base a quanto descritto, abbiamo potuto identificare la sequenza di consenso delle regioni HRE, ((A)/(G)CGTG), nel promotore del miR-302 (*Figura 6*).

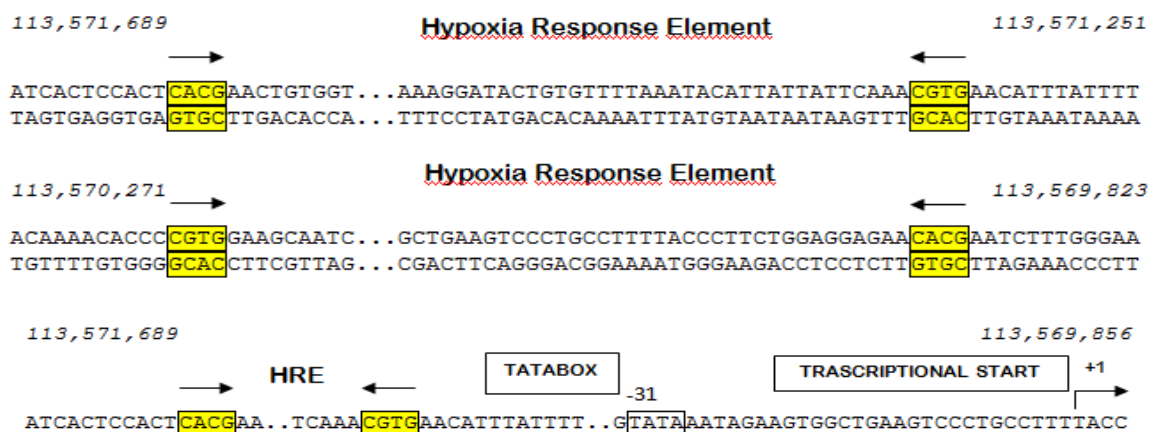


Figura 6.
 Individuazione delle regioni HRE nella regione del promotore del miR-302s

A questo punto, dopo incubazione in ipossia per 48/72h al 2% di ossigeno, abbiamo analizzato l'espressione del miR-302a/b in tre linee cellulari di cancro al seno, di cui, in base alla classificazione molecolare, due linee *Luminal A*, MCF7 e T47D, dal fenotipo epiteliale, e la linea *Claudin low triple negative*, dal fenotipo mesenchimale, MDA-MB-231.

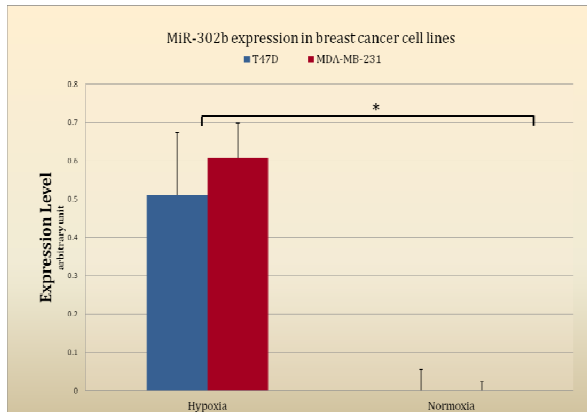


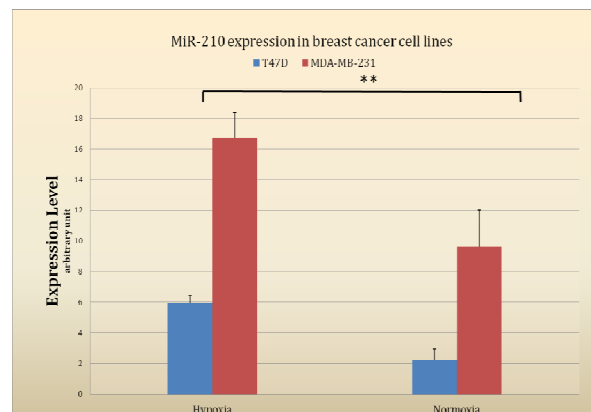
Figura 7.
Espressione del miR-302 nel cancro al seno

Espressione del miR-302b nelle MDA-MB-231 e T47D, dopo 72 ore di trattamento in ipossia al 2% di O₂. L'analisi del T test $P < 0.04$ è stata eseguita sulle medie di 5 campioni in 3 diversi esperimenti.

Abbiamo quindi validato i dati ottenuti con la misura dell'induzione del miR-210 in risposta allo stesso trattamento che ha portato alla espressione del miR-302 b. E' noto infatti in letteratura che l'espressione del miR-210 è indotta in risposta alle condizioni di ipossia (Chan SY et al. 2010 ; Yan Q et al. 2007). Il miR-210 ha dimostrato di aumentare l'attività di MYC inibendo MNT, che è il naturale antagonista di MYC e di regolare il metabolismo sopprimendo la ISCU Protein (Zhang Z. et al. 2009).

Figura 8.
Espressione del miR-210 nel cancro al seno

Espressione del miR-210 nelle MDA-MB-231 e T47D, dopo 72 ore di trattamento in ipossia al 2% di O₂. L'analisi del T test $P < 0.01$ è stata eseguita sulle medie di 5 campioni in 3 diversi esperimenti.



5. Espressione del miR302b nelle mammosfere

Nel 2003 Dontu e colleghi hanno sviluppato una nuova tecnica che ha permesso, per la prima volta, di coltivare cellule staminali mammarie in un sistema di coltura

tridimensionale per ottenere aggregati sferici chiamati “mammosfere”. E’ stato dimostrato che le mammosfere derivano da una singola cellula capace di autorigenerarsi e comprendono precursori indifferenziati capaci di differenziarsi nelle tre linee cellulari che costituiscono l’epitelio mammario (luminale, mioepiteliale e alveolare) (*Dontu et al., 2003*). La coltura delle mammosfere è stata ampiamente utilizzata per incrementare il numero di cellule staminali epiteliali mammarie e cellule staminali tumorali (CSC).

Mammosfere in ipossia

MDA-MB-231 parentali

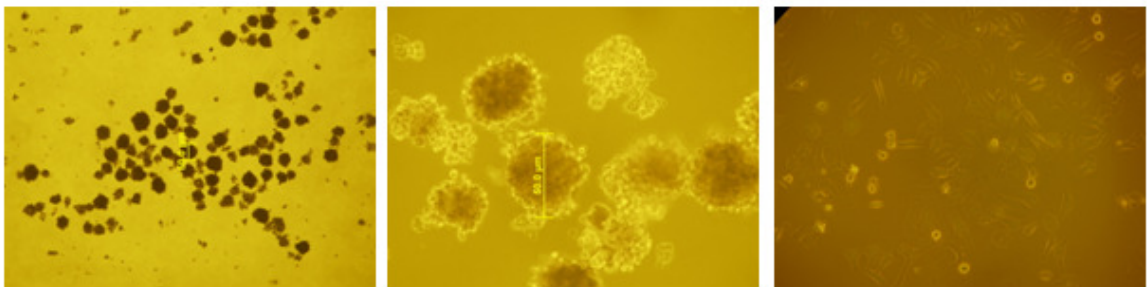
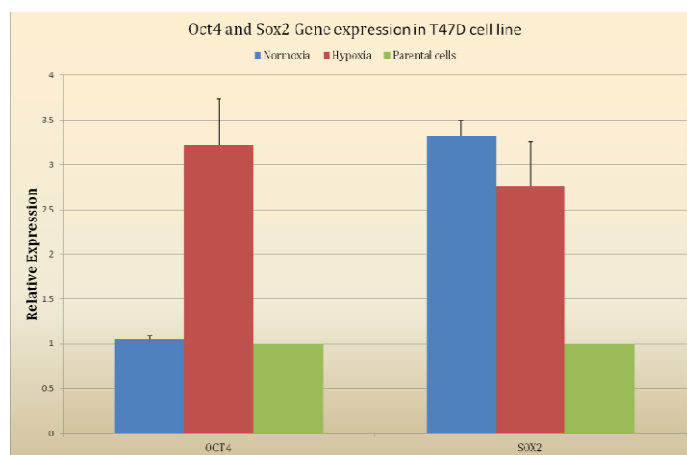


Figura 9.

Mammosfere in coltura.

La linea tumorale cellulare MDA-MB-231 è stata coltivata in un mezzo in sospensione ed in condizioni di ipossia. A destra sono rappresentate le cellule parentali aderenti.

O’Leis et al. hanno dimostrato che quando le cellule, MCF7 e T47D, sono coltivate in condizioni tali che le proprietà staminali vengono indotte, Sox2 è espresso. In base a questo assunto, e già dalla osservazione dell’espressione del miR-302 nei tessuti



tumorali di mammella, abbiamo coltivato le tre linee cellulari già menzionate, MCF7, T47D e MDA-MB-231 in sospensione al fine di ottenere una coltura di mammosfere. Abbiamo eseguito la stessa procedura sia nelle condizioni di normossia, sia nelle condizioni di ipossia.

Figura 10.

Espressione relativa di Oct4 e Sox2 nelle mammosfere

Dopo una settimana di coltura è stata eseguita una RT-PCR su campioni di RNA estratto da mammosfere. Nel grafico è rappresentata l’espressione relativa rispetto al controllo, cellule parentali.

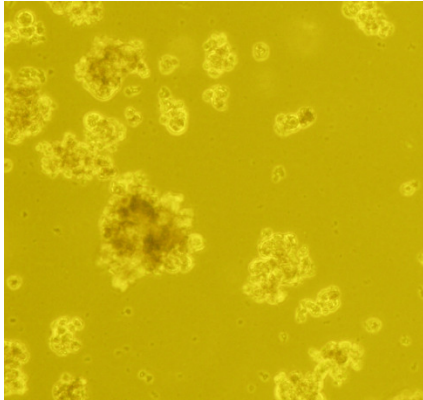


Figura 11.

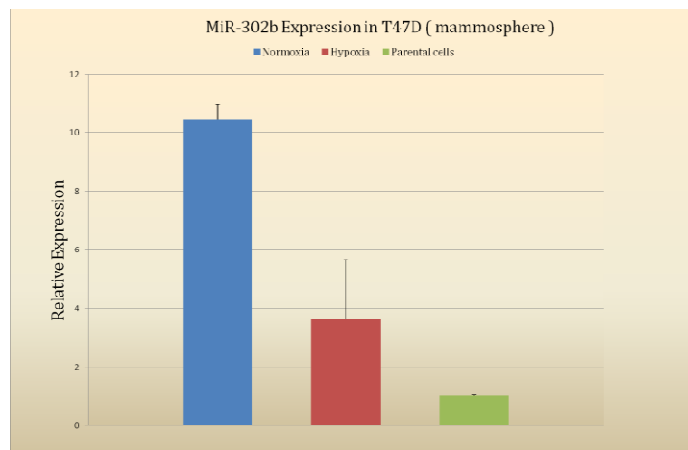
Coltura di mammosfere.

La linea cellulare tumorale di mammella T47D è stata coltivata in piastre tali da mantenere le cellule in sospensione. Dopo una settimana è stato estratto RNA e sono stati misurati i livelli di espressione dei geni della pluripotenza e staminalità nei campioni.

Figura 12.

Espressione relativa del miR-302b.

Espressione del miR-302 in campioni di RNA estratto da colture di mammosfere trattate in condizioni di normossia e ipossia, nella linea cellulare tumorale epiteliale T47D.



Dopo una settimana abbiamo estratto dai campioni RNA e raccolto i lisati proteici. Abbiamo misurato i livelli di espressione dei geni della pluripotenza, Sox2, Nanog e Oct4 e del miR-302 b. I dati ottenuti mostrano induzione del miR-302b con una chiara induzione di Sox2, sia in ipossia, sia in normossia, mentre l'espressione di Oct4 e Nanog sono incrementati solo nelle condizioni ipossiche nella linea tumorale T47D, mentre sembra che ci sia induzione di Nanog sia in normossia che in ipossia nella linea MDA-MB-231. (Dati non mostrati). *O' Leis et al.* hanno fatto osservare l'induzione di espressione di Sox2 nel mammosfere ottenute da colture cellulari tumorali umane del seno e da MCF7 e cellule T47D. Coerentemente con i risultati ottenuti dai tumori umani, non hanno però osservato l'espressione dei geni della pluripotenza, Oct4 e Nanog, in associazione alle sfere. Alcuni studi invece sostengono il contrario in cui viene infatti documentata l' espressione di Oct4 e Nanog in linee cellulari di carcinoma mammario. (*Suo et al, 2005*; *Zhang et al, 2006*; *Cantz et al, 2007*; *Ambady et al, 2010*). Ad ogni modo pare che l'espressione di Sox2 sia già sufficiente e necessaria per indurre nelle cellule funzioni *simil-staminali*. (*O' Leis et al. 2012*)

6. Il miR-302 inibisce l'espressione del recettore degli estrogeni ER alpha

Predire l'impatto dei microRNA (miRNA) sui geni bersaglio è impegnativo a causa degli effetti diversi sulla regolazione a livello trascrizionale e traduzionale. (*Leivonen SK et al. 2009*). Leivonen et al. attraverso l'uso di microarray di lisati proteici (LMA) hanno identificato 21 miRNA, convalidati mediante western blot e qRT-PCR, che down-regolano il recettore degli estrogeni ER alpha, portando ad una inibizione della crescita cellulare estrogeno-stimolata. Tra questi hanno individuato cinque miRNA, che legano direttamente la 3'UTR del gene ESR1, il miR-18a, miR-18b, miR-193b, miR-206, ed il miR-302c.

Nella determinazione del possibile ruolo fisiologico dei miRNA nella regolazione del recettore per gli estrogeni, Leivonen et al. hanno analizzato dati di espressione di Microarray in campioni di cancro al seno. L'analisi è stata condotta sia su tumori ER α positivo sia ER α negativo, correlando l'espressione del recettore a quella dei livelli di espressione dei miRNA. Dall'analisi è emerso che il miR-302c non poteva essere rilevato nella maggioranza dei tumori primari, mentre il miR-18a e miR-18b potrebbero in vivo essere coinvolti in un meccanismo di regolazione nei carcinomi mammari.

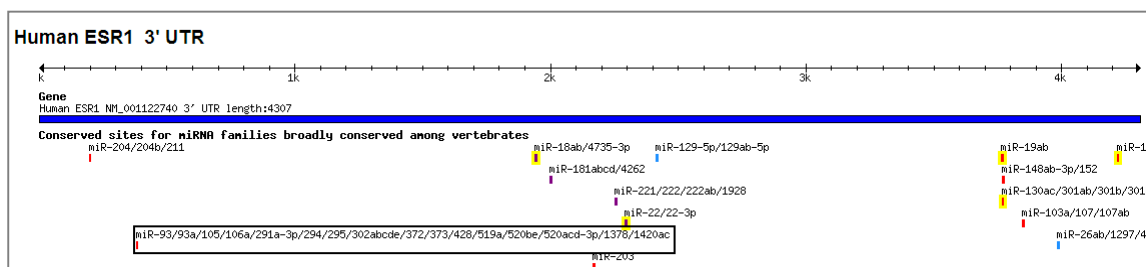


Figura 13.

Dal sito www.targetscan.org

Localizzazione della regione seed del miR-302 nella 3'UTR del gene ESR1 che codifica per la proteina Er a. (trascritto NM_001122742)

Alla luce di quanto già descritto in letteratura e di quanto già mostrato sperimentalmente, abbiamo indagato sul ruolo del miR-302b. Innanzitutto abbiamo riconfermato lo studio di targeting. Sulla base delle predizioni di TargetScan (*Grimson et al., 2007*), il miR-302 abcde presenta uno degli score più alti. Un sito conservato di 7 mer-8m è stato trovato nella posizione 379-385 (chr6:152420480-152420486) nella regione della 3'UTR del gene con un context score percentile dell'87%. Inoltre il gene presenta anche siti bersaglio 7-mer in una regione poco conservata in posizione 1832-1838. Abbiamo clonato un frammento di 385bp (chr6:152420230+152420614)

che copriva l'intera regione comprendente i siti bersaglio nella 3'UTR della luciferasi in un vettore reporter. Il costrutto così preparato è stato trasfettato in cellule HEK293A,

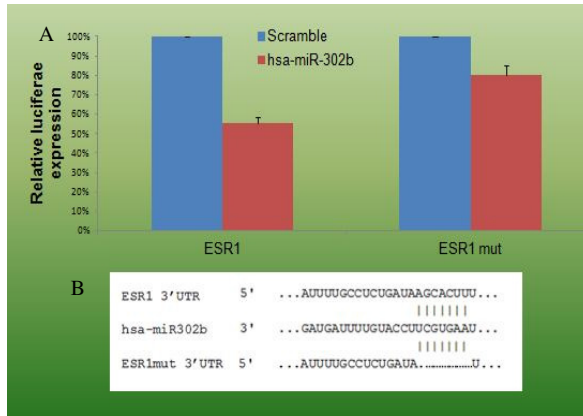


Figura 14.

Espressione relativa della luciferasi .

Le cellule HEK293A sono state trasfettate con il pre-miR302b, il vettore con il gene reporter della luciferasi contenente la regione seed del miR-302b e la Renilla come controllo positivo usato per la normalizzazione del saggio. Il grafico mostra l'espressione relativa anche nei siti mutati da delezione. La figura B mostra le sequenze normali e mutate.

insieme al pre-miR302b ed al plasmide di controllo della luciferasi, la Renilla. L'espressione transiente del miR, inibisce significativamente l'attività del gene reporter così come già previsto, rispetto al controllo (Scramble). I risultati del saggio di luciferasi sono stati successivamente ripetuti su target mutati, in cui il sito bersaglio ha subito una delezione, *figura 14 B*. Il dato è stato quindi validato con esperimenti di mutagenesi, in cui l'espressione della luciferasi non ha subito significativi cambiamenti. Attraverso una indagine preliminare abbiamo studiato i livelli di espressione di E α in linee di cellule tumorali di mammella. I valori più alti di espressione sono nella linea luminal A, precisamente nelle MCF7 e nelle T47D.

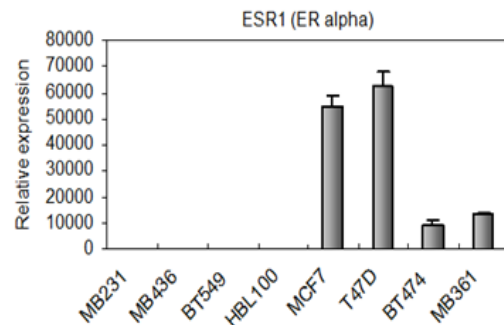


Figura 15.

Espressione relativa di ER α in cellule tumorali di seno

Abbiamo pertanto scelto queste linee cellulari come modello al fine di analizzare i livelli proteici di ER α . Abbiamo pertanto trasfettato le cellule con il pre-miR302b, il controllo negativo Scramble del miR e l'interferenza del trascritto di ER α , siRNA.

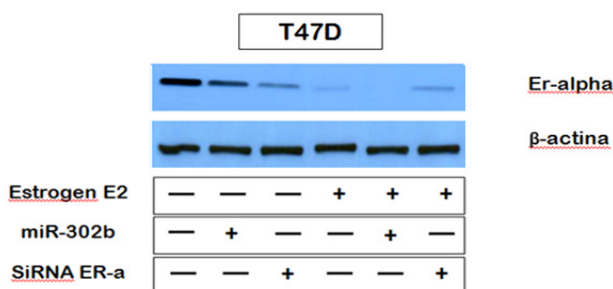


Figura 16.

Western blot di lisati proteici.

La linea cellulare tumorale T47D trasfettata con il miR-302b presenta livelli di espressione di ER α comparabili ai campioni in cui è stato silenziato il gene (siRNA). La figura mostra campioni trattati e non con estradiolo.

7. Effetti dell'inibizione di ERα sull'espressione genica di GATA-3

Una moltitudine di prove hanno dimostrato che GATA3 regola positivamente ERα legandosi sulla regione del promotore del gene (Kouros-Mehr H et al. 2008; Voduc D et al. 2008; Parikh P. et al. 2005). ERα a sua volta ha la capacità di stimolare direttamente la trascrizione del gene GATA3 quando viene traslocato nel nucleo, implicando che questi due fattori si trovano in un *loop* di regolazione positivo reciproco. Il 17β-estradiolo (E2) diffonde attraverso la membrana (MacGregor JJ, Jordan VC 1998) e nel momento in cui l'ormone si lega al proprio recettore, quest'ultimo dimerizza, dal citoplasma trasloca nel nucleo, e si lega a specifiche sequenze di DNA dette *estrogen response elements* (ERE), che sono localizzate a livello dei promotori di geni specifici, dando luogo ad effetti definiti "genomici" (Nilsson, S. et al. 2001). In accordo con questi dati, vi è uno studio che mostra una correlazione significativa tra i livelli elevati di GATA3 e la reattività alla terapia ormonale nei casi di cancro ER-positivo (Parikh P. et al. 2005). Nel complesso, questi dati indicano che GATA3 emerge come un forte predittore di differenziazione del tumore al seno, di reattività agli

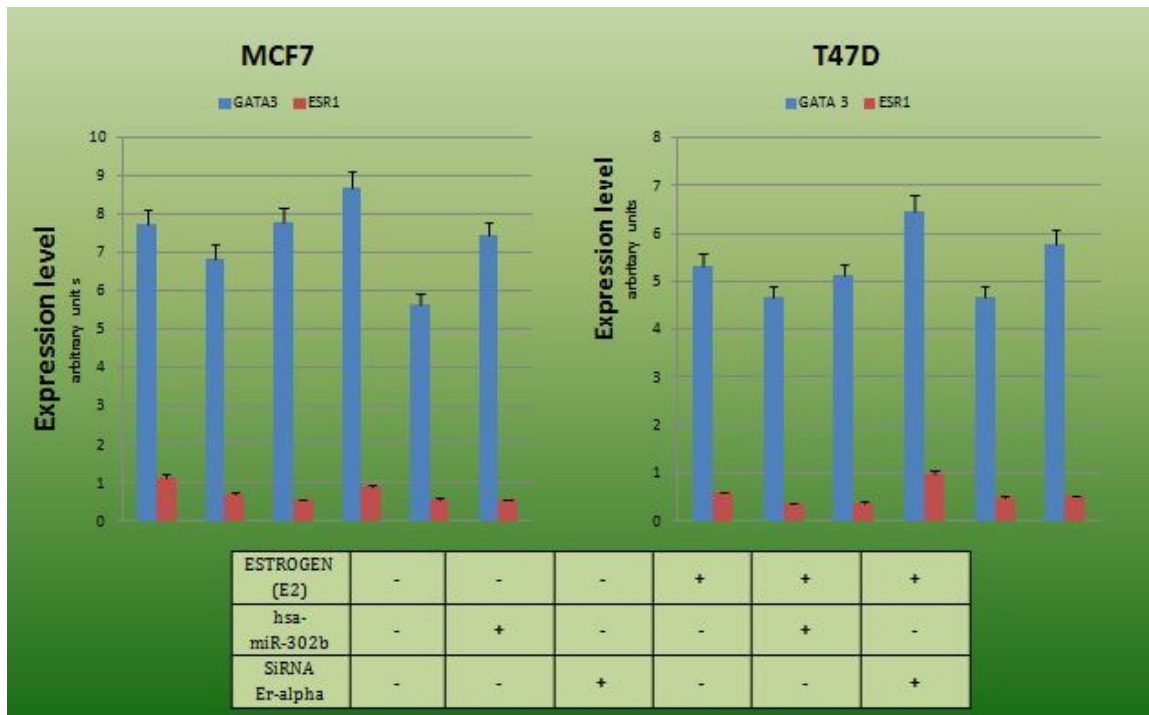


Figura 17.

Livelli di espressione di GATA3 e ERα

La RT-PCR eseguita su campioni di cellule trasfettate e raccolti dopo 24ore dopo trattamento con estradiolo mostra livelli di espressione di GATA 3 significativamente più bassi laddove è espresso il miR-302b.

estrogeni ed il favorevole esito clinico. Data l'importanza dell'espressione del gene nel cancro al seno, abbiamo voluto indagare gli effetti del miR-302b su GATA 3 attraverso la down-regolazione di Era nelle linee cellulari MCF7 e T47D che esprimono sia Era che GATA 3. Dopo 24 ore dalla stimolazione con *17β-estradiolo* (E2), abbiamo raccolto estratti di RNA e lisati proteici di cellule transfettate con pre-miR302b e siRNA di Era coltivate in *phenol red free medium*. I livelli di espressione di GATA 3 risultano essere inferiori laddove è presente il miR-302 b a livelli anche inferiori dell'RNA interference (siRNA), questo potrebbe presupporre un controllo diretto o per una via in aggiunta a ERα. Mentre è evidente un incremento dei livelli di espressione di GATA 3 dipendente dalla stimolazione delle cellule con estradiolo che attiva ERα, così come già ampiamente descritto in letteratura. (*Eeckhoutte J et al. 2007*). Dati che poi sono stati ulteriormente validati dai livelli proteici di GATA 3 e Era.

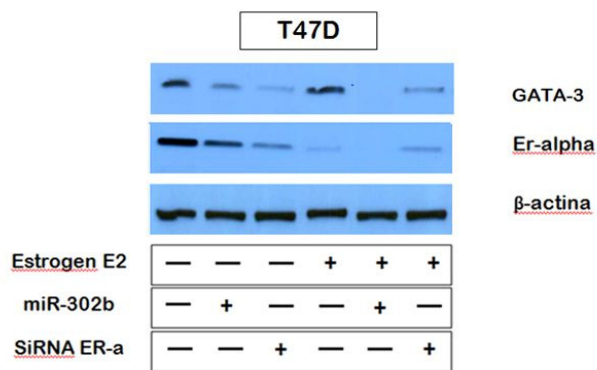


Figura 18.
Western blot di lisati proteici.
 Il lisato proteico (50 Y) di campioni di cellule trattate con estradiolo e non, esprimenti il miR-302b e silenziate con il siRNA di ERα, è stato analizzato tramite western blot. I livelli di Espressione di ERA e di GATA 3, risultano sensibilmente più bassi in presenza del miRNA a livelli quasi comparabili a quelli in cui il trascritto del gene ESRI è stato silenziato.

8. *Gata 3 inibisce le metastasi del cancro al seno attraverso la transizione inversa della transizione epiteliale-mesenchimale*

Wei et al. hanno osservato che GATA3 induce le cellule del cancro al seno con caratteristica di invasività a subire una inversione del meccanismo di transizione epitelio-mesenchimale, portando quindi alla soppressione di metastasi tumorali. GATA 3 si è trovato esclusivamente espresso nella fase precoce dei tumori al seno ben differenziato, non è invece espresso nelle cellule in avanzato stato di cancro invasivo. Per definire il suo ruolo *Yan et al.* hanno impiegato due diversi fenotipi di cellule del cancro al seno, di cui uno GATA3-positivo e quindi non invasivo (MCF-7) e l'altro GATA3-negativo ed invasivo (MDA-MB-231). L'espressione ectopica di GATA3 nelle cellule MDA-MB-231 hanno trasformato il fenotipo cellulare in quello epiteliale ed hanno ridotto l' invasività. Queste cellule hanno anche aumentato l'espressione di *E-caderina*, e diminuito i livelli di

espressione di *Vimentina*, *N-caderina*, e *MMP-9*. Inoltre, nei topi xenotrapiantati cellule MDA-MB-231 che esprimono GATA3 crescono tumori primari più piccoli senza metastasi rispetto ai grandi tumori metastatici derivati dal controllo MDA-MB-231 cellule. GATA3 induce l'espressione di E-caderina attraverso motivi di legame sul suo promotore. Al contrario il silenziamento di GATA3 attraverso l'uso di SiRNA in cellule MCF-7 hanno innescato la trasformazione fibroblastica e quindi hanno acquisito capacità di invasione cellulare, con conseguente metastasi a distanza. Alla luce di quanto descritto precedentemente della correlazione tra la presenza del miR-302 e le metastasi distali, siamo andati a misurare i livelli di espressione di E-caderina in una coltura cellulare transiente di cellule MCF7 per il pre-miR302b.

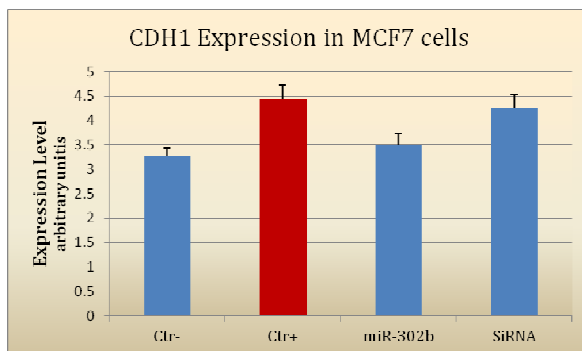


Figura 19.

Livelli di espressione di E-caderina

Cellule trasfettate con il miR-302b mostrano livelli di espressione di E caderina minori rispetto al controllo positivo di coltura cellulare mantenuta in phenol red free medium trattata con estradiolo e raccolta dopo 24 ore, ma non relativamente al controllo negativo (senza trattamento in medium phenol red free) ad indicare che l'effetto sulla espressione di CDH1 è mediata attraverso il silenziamento di ERα.

9. Aspetti funzionali

9.1 Saggio di proliferazione

Gli estrogeni, attraverso i loro recettori che mediano il processo, sono in grado di stimolare la proliferazione sia delle cellule normali sia delle cellule trasformate attraverso l'induzione di proteine implicate nella sintesi degli acidi nucleici e la conseguente attivazione di geni che regolano le divisioni cellulari. L'aumento della proliferazione cellulare può incrementare le possibilità per quanto riguarda gli errori di riparazione nel DNA con il risultato di un accumulo di mutazioni. Questi cambiamenti nella doppia elica di acido nucleico possono contribuire alla progressione da una cellula normale ad una cellula iperplastica fino ad arrivare alla cellula neoplastica. La rimozione di rosso fenolo, l'indicatore di pH nel terreno di coltura che è debolmente estrogenica (*Berthois Y. et al ; Proc Natl Acad 1986*), rallenta immediatamente il tasso di proliferazione delle cellule, e cellule MCF-7 cresciute in terreno rosso fenolo con siero

charcoal dextrantreated per periodi fino a 1 mese mantengono questo tasso ridotto di proliferazione cellulare. Nelle cellule coltivate in mezzo *phenol red free* anche per brevi periodi, l'estradiolo stimola una proliferazione marcata e riproducibile, e gli antiestrogeni inibiscono la proliferazione stimolata.

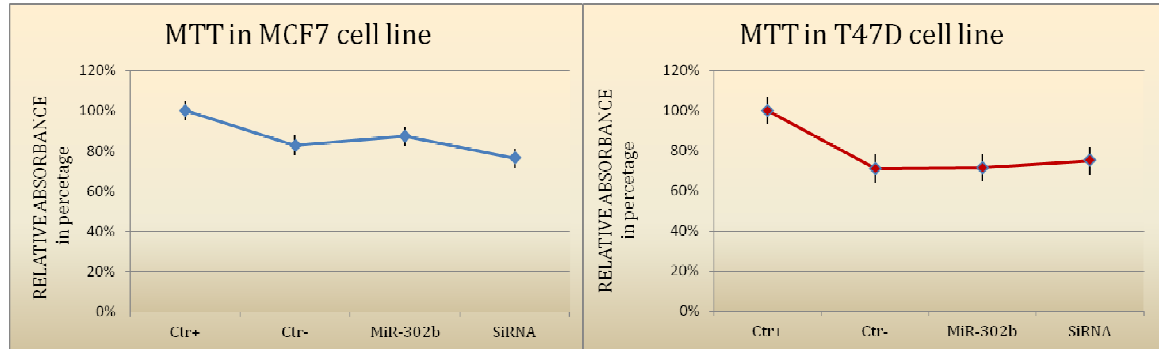


Figura 20.

MTT assay nelle MCF7 e T47D

In una 96well sono state seminate 20,000 cellule della linea tumorale MCF7 e la linea stabile per il miR-302b, T47D. Cresciute in phenol red free medium, sono state trattate con estradiolo al fine di poter valutare gli effetti del miR-302b sulla proliferazione cellulare. I dati sono stati ottenuti 72 ore dopo il trattamento.

Abbiamo misurato la densità ottica nel saggio MTT (*CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Promega*) dopo 72 ore dal trattamento con estradiolo nelle cellule MCF7 e T47D. Questo tipo di test ci consente di valutare gli effetti del miR-302b sulla capacità delle cellule di proliferare. Il metodo omogeneo è utile per determinare il numero di cellule vitali in coltura e si basa sulla quantificazione dell' ATP presente, un indicatore di cellule metabolicamente attive. Il risultato del test viene valutato misurando allo spettrofotometro le densità ottiche emesse dai diversi pozzetti di una 96 plate. L'assorbanza relativa in percentuale, così come rappresentata in figura, nelle cellule trasfettate con il pre-miR302b, mostrano livelli comparabili a quelli in cui è presente l'RNA interference del recettore degli estrogeni ER α .

9.2 Stable cell lines

9.2.1 Clonaggio del cluster umano in pEGFPc1

Si è deciso di amplificare la seguente sequenza chr4:113788534-113789841, di 1307 bp, contenente il cluster del miR-302, escluso il miR-367 e una regione (conservata) di 679 bp come verificato su UCSC Genome Browser on Human Mar. 2006 (NCBI36/hg18) Assembly (Figura) e clonato nel vettore di espressione pEGFPc1

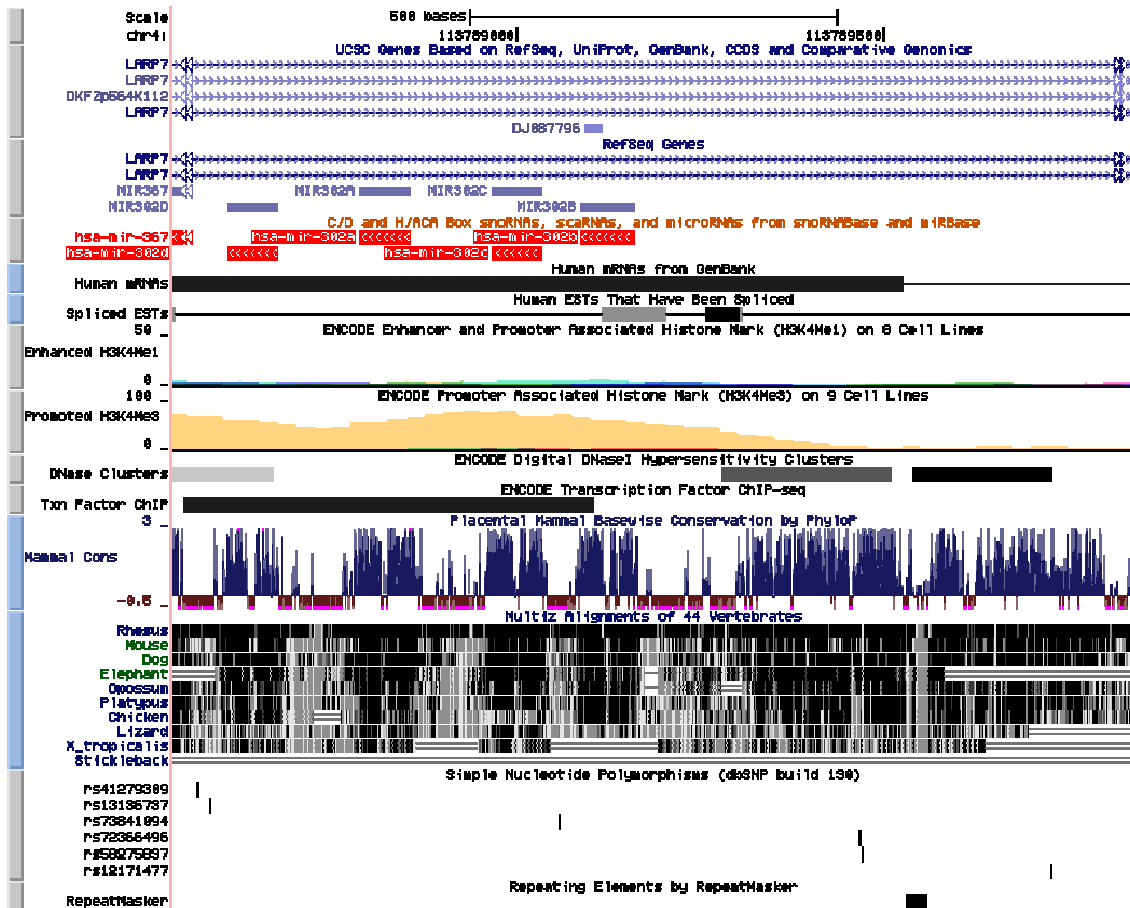


Figura 21 . chr4:113788534-113789841

La sequenza visualizzata è intronica. Dall'alto verso il basso è possibile visualizzare: l'elica forward, codificante per LARP7; l'elica reverse, codificante per il cluster del 302; i miR-302b, miR-302c, miR-302a, miR-302d; il trascritto maturo; il grado di metilazione della sequenza; la sensibilità al trattamento con DNasi il livello di conservazione della sequenza nei mammiferi e in altre specie di animali

La regione amplificata corrispondente ai precursori dei miR-302 contiene sequenze estremamente conservate, come ci si attende per i microRNA. Inoltre, a monte del cluster del miR-302 sono presenti due regioni anche esse molto conservate che non codificano per RNA. Queste regioni risultano essere molto sensibili al trattamento con DNasi, e quindi corrispondono a regioni di cromatina in attività, solo in ES cells. Il picco giallo corrispondente ai microRNA (figura 18), indica la trimetilazione della lisina 4 della proteina istonica H3 (H3K4Me3) ed è associato a promotori, che sono attivi o possono essere attivati. Il colore giallo del picco indica che la metilazione in questa zona è presente solo in ES cells e non in altre 8 linee cellulari umane non staminali. Nel caso di Larp7, espresso in tutti i 9 tipi cellulari considerati, la sovrapposizione dei siti di metilazione nei 9 tipi cellulari, corrisponde ad una zona di colorazione nera.

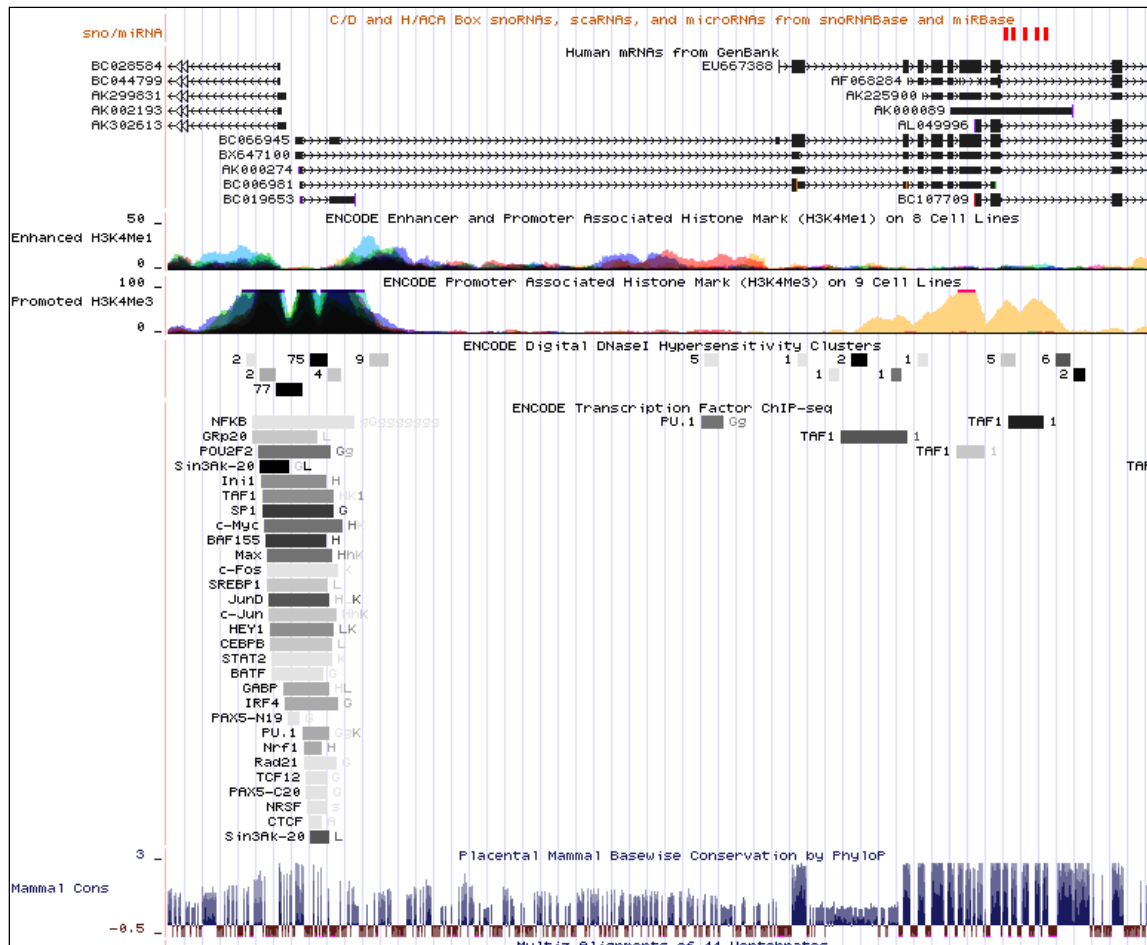


Figura 22.

Sequenze conservate del miR-302 e LARP7.

L'immagine mostra che la regione conservata del miR-302 è associata con la trimetilazione della lisina 4 della proteina istonica H3 solo nelle ES cells. Mentre la regione conservata di LARP7 è associata con H3K4Me3 anche in altri 8 diversi tipi cellulari. La regione conservata del miR-302 presenta dei piccoli cluster ipersensibili alla DNasi e codifica per delle sequenze TAF.

Il miR-302 umano clonato è stato generato dopo taglio con l'enzima BglII, nel sito BglII presente nella regione del polylinker del vettore pEGFPc1.

9.2.2. Trasfezione del costrutto ricombinante pEGFP-c1-miR302

Il costrutto ricombinante da noi ottenuto, pEGFPc1-miR302, è stato trasfettato in due tipi di cellule, le H1299 e le HEK293 insieme al solo plasmide non contenente l'inserto, che rappresenta il gruppo di controllo.

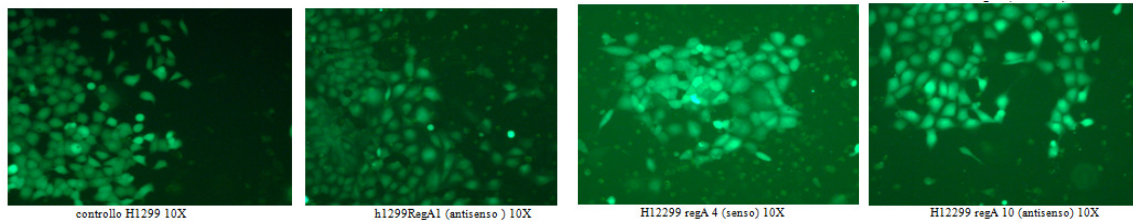


Figura 23.

Selezione dei cloni positivi esprimenti EGFP-miR302 in H1299 cells al microscopio a fluorescenza (risoluzione 10X) rispetto al Controllo.

Le immagini mostrano i cloni selezionati con G418 delle H1299 trasfettate, rispettivamente, con il vettore di controllo, vuoto, con il vettore con l'inserto orientato secondo il reading frame della EGFP (senso) e con il vettore contenente l'inserto orientato nel verso opposto al reading frame del gene reporter (antisenso).

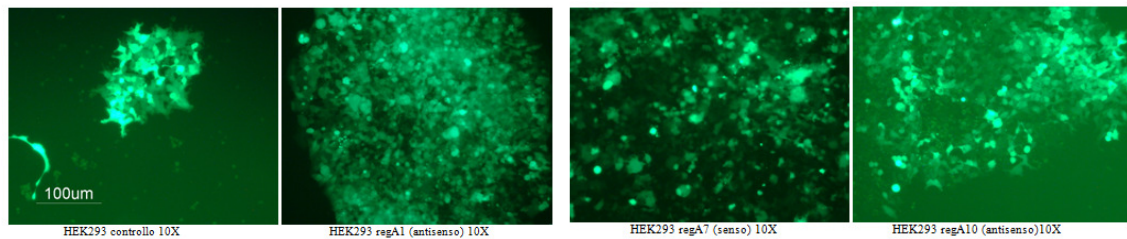


Figura 24.

Selezione dei cloni positivi esprimenti EGFP-miR302 in HEK293 cells al microscopio a fluorescenza (risoluzione 10X) rispetto al Controllo.

Le immagini mostrano i cloni selezionati con G418 delle H1299 trasfettate, rispettivamente, con il vettore di controllo, vuoto, con il vettore con l'inserto orientato secondo il reading frame della EGFP (senso) e con il vettore contenente l'inserto orientato nel verso opposto al reading frame del gene reporter (antisenso).

I singoli cloni selezionati sono costituiti da cellule con diversa forma, dimensioni e intensità di fluorescenza. Non vi è una differenza significativa tra i cloni senso, antisenso e di controllo delle stesse linee cellulari.

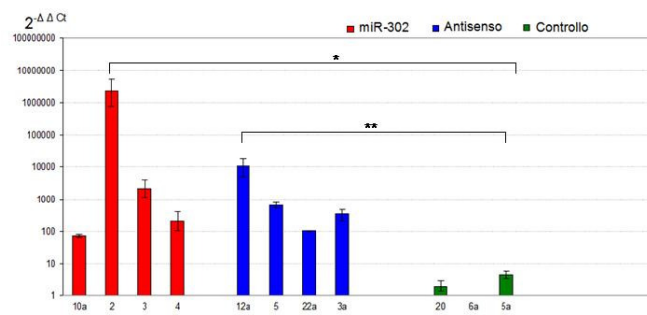


Figura 25. Real Time PCR per la detezione del miR-302a maturo nelle H1299 trasfettate .

Le singole barre indicano l'espressione relativa (normalizzata su U6) per ognuno dei microRNAs valutati. I valori riportati sono la media di 3 esperimenti indipendenti.

Leggenda: 10a, 2, 3,4: cellule trasfettate con il vettore senso; 12a,5,22a,3a: cellule trasfettate con vettore antisenso ; 20,6a, 5a, cellule trasfettate con il plasmide vuoto (controllo).

Contrariamente a quanto ci si aspettava, il miR-302a maturo è risultato essere espresso anche nell'RNA estratto da cellule trasfettate con il vettore antisenso, sia nelle H1299 che nelle HEK293.

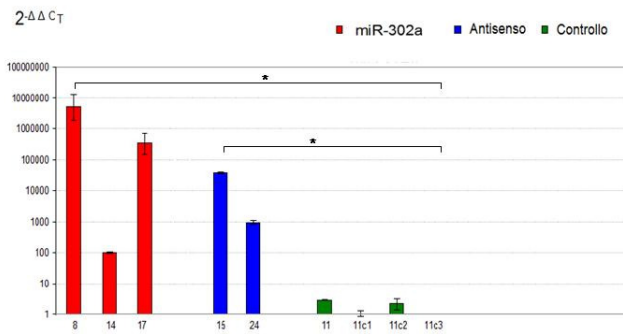


Figura 26. Real Time PCR per la detezione del miR-302a maturo nelle HEK293 trasfettate.

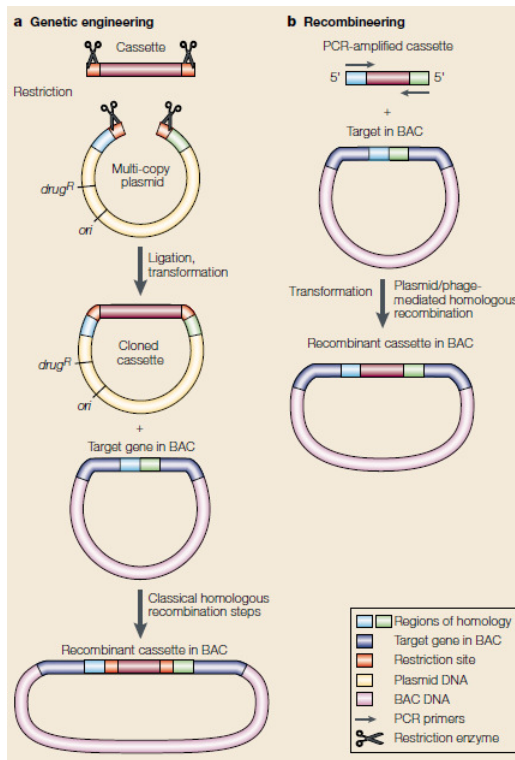
Le singole barre indicano l'espressione relativa (normalizzata su U6) per ognuno dei microRNAs valutati. I valori riportati sono la media di 3 esperimenti indipendenti.

Leggenda: 8,14,17: cellule trasfettate con il vettore senso; 15,24: cellule trasfettate con vettore antisense ; 11,11c1,11c2,11c3: cellule trasfettate con il plasmide vuoto (controllo).

9.2.3 MDA-MB-231 e T47D breast cancer stable cell lines

Abbiamo generato linee di cellule tumorali di mammella T47D e MDA-MB-231 che esprimono costitutivamente il miR302b, utilizzando il Kit *Lenti-miR™ microRNA Precursor Clones* della SBI. (in materiali e metodi)

9.3 Transgenic Mouse



Dopo aver rilevato l'espressione del miR-302 in alcune cellule di carcinoma mammario all'interno della massa tumorale ed aver osservato che le donne con metastasi hanno un numero maggiore di cellule positive al miR-302 nel loro tumore, abbiamo capito che è necessario un approccio di studio diverso per poter rilevare in modo efficiente l'espressione del miR-302 nella singola cellula e non nella massa, così come generalmente misurato dai saggi molecolari. Nel nostro lavoro, abbiamo usato l'ibridizzazione in situ sui tessuti, ma questa tecnica non può essere efficacemente

Figura 27.

Tecnologia classica e Recombineering a confronto

(per la spiegazione vedi testo)

applicata a cellule vive, e nemmeno utilizzata per il *sorting* cellulare. Per poter approfondire il legame tra il cancro, le cellule staminali e l'attivazione del miR-302 proponiamo quindi un approccio alternativo ed innovativo, un topo *knock-in* dove solo quelle poche cellule tumorali pro-metastatiche che esprimono il miR-302 sono fluorescenti. La tecnica utilizzata per generare un topo knock-in è quella del *recombineering* (da *recombination engineering*, *ingegneria di ricombinazione*), una tecnologia usata per modificare il DNA in batteri (in particolar modo *Escherichia coli*) usando la ricombinazione omologa. In particolare il sistema di ricombinazione omologa è alquanto diverso da quello classico dell'ospite batterico basato sulle proteine RecBCD e RecA. Il sistema di ricombinazione omologa impiegato nel *recombineering* è caratterizzato da un'attività esonucleasica, rappresentata dalla proteina Red alpha (5'>3' esonucleasi) e da un'attività di annealing rappresentata da Red beta. Entrambe queste proteine sono codificate dal fago λ (geni *exo* e *bet* rispettivamente). Una terza proteina (Red gamma, codificata dal gene *gam*) incrementa l'efficacia di questo sistema inibendo un'attività esonucleasica dell'ospite (RecBCD). In alternativa a questo sistema è possibile utilizzare quello basato sulle proteine RecE e RecT. Tale sistema, pur non essendo del tutto simile a quello basato su Red alpha e Red beta, condivide le stesse attività enzimatiche con il sistema Redalpha/Redbeta. La principale caratteristica della ricombinazione omologa che avviene durante la reazione di *recombineering* è la presenza di regioni di omologia al DNA in cui ricombinare, piccole fino a 30 nucleotidi, su entrambi i lati del DNA ricombinante. Questa regione di omologia può essere facilmente inserita in oligonucleotidi usati per amplificare mediante PCR il DNA ricombinante.

La tradizionale tecnologia di ingegneria genetica, che utilizza gli enzimi di restrizione e la DNA ligasi per tagliare e ricongiungere i frammenti di DNA, fallisce quando i target contengono centinaia di Kilobasi di DNA. Questo perché anche rari siti di restrizione hanno comunque una frequenza apprezzabile sulle molecole di DNA di grandi dimensioni come cromosomi batterici artificiali (BAC). Inoltre la manipolazione in vitro di DNA lineari di questa lunghezza è estremamente difficile. Una volta che si è reso disponibile la tecnologia di clonazione di BAC in *Escherichia Coli*, la modifica dei cloni è diventata un problema da affrontare. I problemi quindi con l'approccio tradizionale sono stati superati con la tecnica di *Recombineering*, che utilizza le funzioni di ricombinazione omologa caratteristica dei fagi (*Figura B, Neal G. Copeland, Nancy A. Jenkins and Donald L. Court 2001*). Attraverso questo tipo di

tecnica è possibile ottenere molecole ricombinanti con solo 50bp di omologia (o meno); regioni omologhe per ricombinazione di solito richiedono di essere ~ 500 bp, mentre negli approcci recombineering, hanno bisogno di essere solo il 40-50 bp di lunghezza. (Ori, origine di replicazione.)

La tradizionale tecnica di ingegneria genetica prevede i seguenti passaggi per generare un BAC ricombinante:

- Il clivaggio della cassette di DNA con un enzima di restrizione.
- Il clivaggio di un DNA bersaglio su un plasmide con un enzima di restrizione.
- Ligasi della cassetta al plasmide.
- Trasformazione del plasmide in cellule batteriche competenti.
- selezione dei cloni farmaco-resistenti (drugR).
- Screening dei cloni modificati e verifica della cassetta clonata.
- Trasformazione di un ceppo batterico contenente il BAC per ottenere la modifica con la cassetta clonata attraverso la ricombinazione omologa.

Tecnica di Recombineering per generare un BAC ricombinante:

- Amplificare una cassetta mediante PCR con le regioni di omologia.fiancheggianti
- Introduzione di un BAC in un ceppo batterico che svolge funzioni di ricombinazione.
- Trasformazione di cellule contenenti il BACe le funzioni di ricombinazione con la cassetta.
- Generazione di un ricombinante in vivo.
- Rilevamento di un ricombinante per selezione e counterselection o dallo screening diretto (ibridazione colonia).

Come esperimento pilota abbiamo eseguito la trasfezione del pri-miR302 in cellule HEK293A al fine di co-esprimere il miR-302s e il gene reporter. Abbiamo in prima analisi identificato il punto di inizio del trascritto. Attraverso delle PCR che amplificavano corti frammenti di sequenze in successione della regione a monte del primo miR del cluster, abbiamo individuato il punto di inizio della trascrizione del pri-miR-302s. (*Figura 28*)

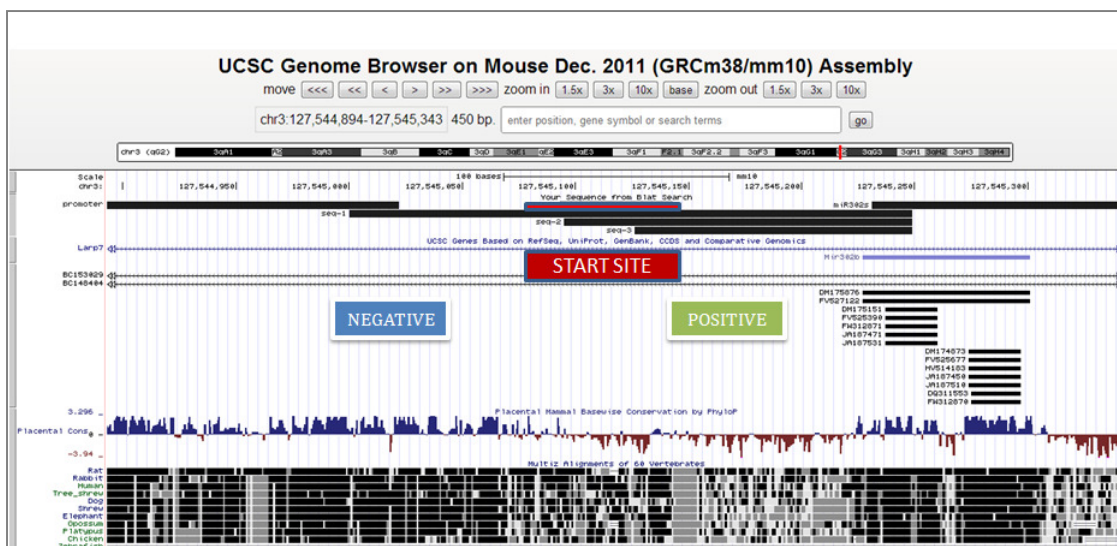


Figura 28.

Rappresentazione delle sequenze amplificate

La figura A mostra le sequenze amplificate per PCR di cDNA di ES di topo dal sito UCSC, (<http://genome.ucsc.edu>). I putativi



trascritti del miR-302 sono rappresentati da barre nere. Abbiamo identificato il punto di inizio della trascrizione (positive)dalle bande positive avute su gel di agarosio. (Figura B). La barra rossa indica la regione del sito di inizio della trascrizione del Pri-miR302. La regione del miR-302s è stata amplificata e visualizzata su gel come controllo positivo (Figura B).

In analogia al pri-miR302 nell'uomo, abbiamo clonato una regione di 1974bp nei siti KpnI e BamHI rispettivamente al 5' e al 3' del vettore *pmR-ZsGreen1* (Clontech).

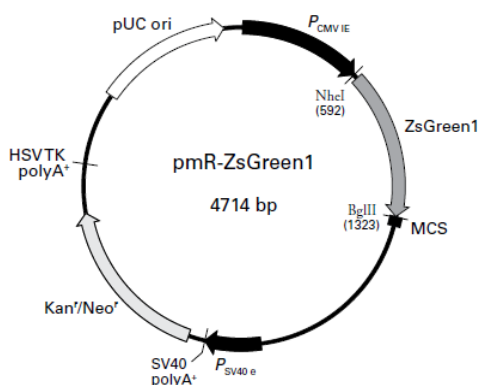


Figura 29.

Il vettore *pmR-ZsGreen1*

Il sito di clonaggio (MCS) è posizionato nella 3'UTR, a valle della sequenza codificante *ZsGreen1*.

pmR-ZsGreen1 è un vettore di espressione di mammifero progettato per esprimere costitutivamente un microRNA di interesse. Cellule transfettate possono essere identificate dalla co-espressione di *ZsGreen1*, una variante ottimizzata della proteina fluorescente della specie *Zoanthus sp*, progettata per una fluorescenza migliore (eccitazione ed emissione massima: 493 e 505 nm, rispettivamente). Il sito di clonaggio (MCS) è posizionato nella 3'UTR, a valle della sequenza codificante *ZsGreen1*. *ZsGreen1* ed i precursori di

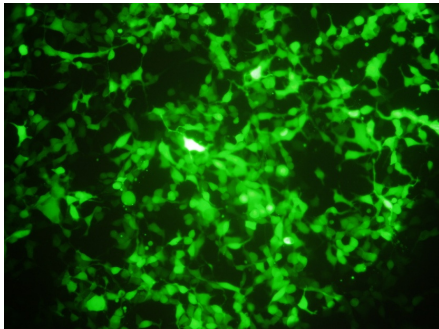


Figura 30.
Espressione della proteina ZsGreen.
Cellule HeK293A sono state trasfettate con il costrutto contenente il pri-miR-302. La foto al microscopio a fluorescenza mostra la co-espressione della proteina ZsGreen.

espressione di microRNA clonati nella MCS sono sotto controllo del promotore umano costitutivamente attivo (pCMV IE), situato a monte della sequenza ZsGreen1. Sia la proteina fluorescente che il microRNA sono espressi da un unico trascritto di mRNA, che viene scisso da Drosha e Dicer per generare il microRNA maturo. Abbiamo trasfettato il costrutto così preparato in cellule HEK293A al fine di confermare la contemporanea espressione della proteina ZsGreen e del miR-302. (*Figura 30*)

Da RNA estratto da campioni abbiamo eseguito la RT-PCR per confermare l'espressione del miR-302s non normalmente espresso in questa linea cellulare. (dati non rappresentati).

Una volta avuto conferma della co-espressione del gene reporter (ZsGreen) e del miR-302s, abbiamo pianificato la strategia per ottenere il costrutto così come rappresentato e spiegato nella Figura 31.

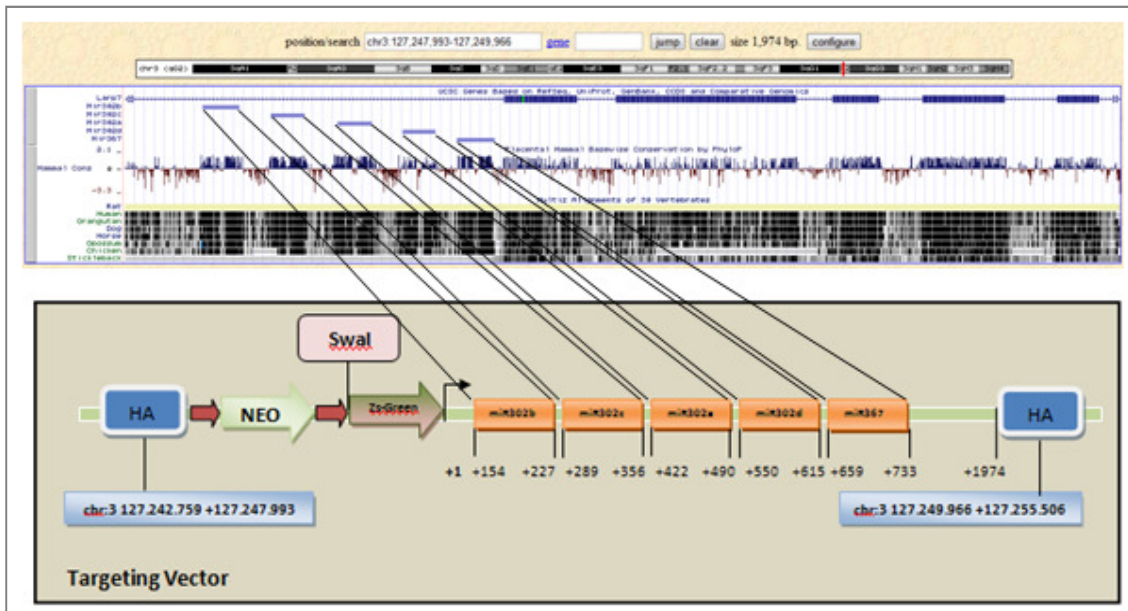


Figura 31
Rappresentazione schematica del costrutto

Nella figura HA sono le regioni di omologia che fiancheggiano entrambi i lati la regione del miR-302s. La cassetta NEO (neomicina) è stata clonata a monte del gene reporter ZsGreen. Le frecce rappresentano i siti LOXP che serviranno ad eliminare la cassetta NEO dopo selezione positiva dei cloni ricombinanti di ES di topo.

Gli RNA non codificanti (ncRNAs) rappresentano la nuova frontiera dei meccanismi umani di regolazione post-trascrizionale. I ncRNAs possono bersagliare specificatamente differenti geni. Il livello di espressione di un singolo ncRNA incide su più pathways. Diversi studi hanno permesso di comprendere la funzione dei ncRNAs e il loro impatto sulla patogenesi di malattie complesse incluso il cancro, malattie cardiache, disordini immunitari, malattie neurodegenerative e malattie metaboliche.

Recentemente si stanno conducendo esperimenti atti a conoscere meglio i meccanismi d'azione e il possibile utilizzo terapeutico di una determinata classe di RNA non codificanti regolatori, i microRNA. I miRNA sono responsabili del silenziamento di più mRNA bersaglio a cui si legano nella regione 3' UTR. Diversi lavori hanno dimostrato che il miR-302 è coinvolto nei meccanismi di rigenerazione cellulare, mantenimento della staminalità e pluripotenza. Infatti il miR-302 aumenta la demetilazione della lisina 4 dell'istone 3 (H3K4) e innesca una serie di meccanismi che determinano e l'attivazione dei fattori di pluripotenza Oct3/4 e Nanog e la demetilazione globale, con conseguente compattamento della cromatina di diversi geni che quindi non saranno trascritti. Determina una rapida transizione delle cellule dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare attraverso la degradazione della ciclina D1 e del complesso ciclina D1/CDK4/6. È anche un antagonista della p63 che regola l'apoptosi nella linea germinale.

Inoltre sembra regolare la risposta delle cellule staminali alla differenziazione e le guida verso un corretto sviluppo embrionale nelle prime fasi della differenziazione. Infatti inibisce Lefty, l'effettore intermediario negativo del pathway di Nodal. Oltre a permettere la specificazione del mesendoderma, il miR-302 sembra essere coinvolto nella differenziazione tra i sessi, dato che risulta essere diversamente espresso nelle gonadi maschili e femminili durante le prime fasi della differenziazione. Nel nostro laboratorio sono stati condotti diversi studi per indagare sulle caratteristiche e sull'azione del miR-302. Per prima cosa sono stati eseguiti dei microarrays per miRNA su ESC umane, corpi embrioidi (EB), trofoblasti, monostrati spontaneamente differenzianti e diversi tessuti sani, per avere informazioni sull'espressione del miR-302 e di altri miRNA. I risultati dello studio hanno confermato i dati riscontrati in letteratura, secondo cui il miR-302 è altamente espresso solo nelle cellule staminali pluripotenti e non in altri tipi di cellule staminali, come le cellule staminali neuronali e la sua espressione diminuisce durante il differenziamento di queste cellule fino a scomparire. Nei tessuti adulti sani non è stata riscontrata l'espressione del miR-302 che

è invece risulta essere espresso nei corpi embrioidi in D7 e D14 e minimamente anche nei monostrati che si sono differenziati spontaneamente. Quindi l'espressione del miR-302 è ontogeneticamente e gerarchicamente regolata. La variazione dell'espressione del miR-302 nel tempo, durante il differenziamento, non risulta progressiva, ma si osserva un picco di espressione intorno a D5, seguito da una fase stazionaria e da un calo che comincia in D10. Questa espressione transiente è da interpretare come dovuta al ruolo del miR-302 come guida cellulare durante le prime fasi della differenziazione piuttosto che connessa con il mantenimento della staminalità. Infatti la variazione dell'espressione del miR-302 nei primi giorni del differenziamento si discosta da quella dei fattori che determinano la staminalità e la pluripotenza come Oct4 e Nanog (*Athanasios Zovoilis et al.2008*). Secondo diversi studi la concentrazione di un dato miRNA è specifica per lo svolgimento di una determinata funzione. Tramite il profilo di espressione da noi condotto è stato identificato che lo squilibrio positivo miR-302/miR-203 (il miR-302 attivo e il miR-203 spento) è una firma identificabile delle cellule staminali pluripotenti. Infatti le cellule pluripotenti analizzate sono caratterizzate da elevati livelli di miR-302 embrionale e dall'assenza del repressore della staminalità miR-203. Questo profilo di espressione può essere molto utile quindi per meglio comprendere i meccanismi che stanno alla base della specificità di azione dei miRNA che non dipende solo dal livello della loro espressione, ma anche dal rapporto che i fattori con cui interagiscono. Si sa che i miRNA si legano alla sequenza del 3'UTR dell'mRNA bersaglio, complementare con la loro regione seed in 5'. Vi sono però miRNA che presentano tra loro un' alta corrispondenza della regione seed , ma sono coinvolti in meccanismi diversi. Quindi la specificità di azione potrebbe dipendere da altre sequenze di riconoscimento che mediano l'interazione con altri fattori. Infatti il profilo di espressione ha rivelato che i miRNA analizzati presentano patterns specifici di espressione. Ulteriori studi sono stati condotti sul promotore del miR-302 murino che è stato inserito nel vettore di clonaggio pZsGreen1-1 (Clontech). Questo plasmide presenta un sito di clonaggio multiplo, contenente siti di taglio riconosciuti da enzimi di restrizione, localizzato a monte di un gene reporter (pZsGreen1-1) che conferisce una fluorescenza verde al plasmide. I cloni ottenuti sono stati espansi ed il DNA plasmidico è stato estratto ed utilizzato per una trasfezione con lipofectamina in ESC murine. La trasfezione è avvenuta con successo, a conferma della funzione promotrice della regione conservata del miR-302. I cloni selezionati, con G418, sono stati piccati e ciascuna colonia è stata fatta crescere, una parte su un supporto di gelatina e l'altra parte su

feeder layers, costituiti da fibroblasti di topo, che in aggiunta al LIF determinano il mantenimento della staminalità. La crescita dei cloni sui diversi supporti è stata progressivamente monitorata con microscopio a fluorescenza. I dati mostrano i cloni in giorno 1 (D1) dopo la semina e giorno 10 (D10) analizzati con luce fluorescente, che permette la visione solo delle cellule esprimenti GFP, trasfettate e con luce visibile con cui si vedono tutte le cellule in coltura. In D1 non si osservano significative differenze tra le cellule in crescita sui diversi terreni: le cellule su gelatina sembrano più numerose rispetto a quelle su *feeders*, ma questo può dipendere dalla dimensione del frammento della colonia messa in coltura. Dopo dieci giorni, in D10, si osserva una grande differenza tra le cellule dei due terreni. Mentre su *feeders* le cellule continuano a crescere, su gelatina si osserva una forte riduzione della fluorescenza verde. Le cellule rimaste sul *feeder* di MRF sono concentrate in alcuni punti, mentre su gelatina si osserva una crescita diffusa. Questo dato è molto importante perché dimostra che è l'attività del promotore del miR-302 a diminuire durante il differenziamento cellulare. Quindi la sequenza promotrice è gerarchicamente e ontogeneticamente regolata. Se il promotore è il bersaglio di fattori presenti nelle cellule mature o nelle cellule staminali non pluripotenti, introducendo delle mutazioni nella sequenza, si potrebbe impedire o quantomeno ridurre la deregolazione della sua attività nelle cellule in differenziazione. In questo modo, ottenendo un riscontro positivo, si individuerrebbe la specifica sequenza riconosciuta e tramite un'analisi computazionale si potrebbero ricercare i possibili ligandi. Da tener presente che molto probabilmente sul gene del miR-302 agiscono anche repressori nelle cellule differenziate, assenti nelle ES cells.

Una elevata espressione del miR-302 è stata osservata in due tumori rari collegati a cellule germinali (*Clevers H.*), quali il *seminoma* (un cancro testicolare che si ritiene sia generato dall'epitelio germinale dei tubuli seminiferi) e *teratocarcinoma* (che origina dalle cellule embrionali *multipotenti*). Abbiamo studiato l'espressione del miR-302 nei tessuti tumorali. La conferma della presenza del miR-302 nei tumori solidi dalla nostra banca dati e la successiva conferma avuta con la tecnica di *ibridazione in situ* ISH su campioni di tessuti ottenuti da donne in cui è stato riscontrato cancro al seno, a livelli di espressione mai paragonabili a quelli delle ESC e iPSC, ha portato a due alternative spiegazioni: o solo una piccola percentuale di cellule tumorali si presenta con elevati livelli di miR-302 o è presente una diffusa, ma basale, attivazione del miR-302 in tutte le cellule maligne. Esperimenti di co-localizzazione con CD44 hanno dimostrato che molte cellule tumorali erano sezioni positive al CD44, di cui solo una parte erano

positive anche per il miR-302 (circa 10:1). Inversamente, tutte le cellule che esprimevano il miR-302 sono risultate positive per il CD44. Inoltre, le cellule miR-302 positive avevano le caratteristiche citologiche di cellule tumorali ed esprimevano la citocheratina AE 1/3, confermando che erano cellule epiteliali maligne. D'altra parte invece, nel seno normale, non è stato rilevato alcun segnale positivo al miR 302. Questa osservazione conferma una delle ipotesi e cioè che il locus del miR302 è probabilmente attivo in una sub-popolazione di cellule che possiamo definire *simil-mesenchimali* staminali.

Il carcinoma della mammella è una malattia complessa ed eterogenea. La *Gene expression profile* ha contribuito in modo significativo alla nostra comprensione di questa eterogeneità a livello molecolare, refinendo la tassonomia sulla base di semplici caratteristiche come il tipo istologico, il grado del tumore, lo stato del nodo linfatico e la presenza di marcatori predittivi come il recettore degli estrogeni e HER2, *human epidermal growth factor receptor 2*, con una classificazione più sofisticata che comprende Luminal A, Luminal B, basale-like, sottogruppi HER2-positivo e normale. (*Holliday D and Speirs V, 2011*) In laboratorio, lo studio del cancro al seno è spesso modellato utilizzando linee cellulari stabilizzate, che possono riflettere l'eterogeneità della malattia in vivo. In base a questo assunto abbiamo indagato sulla presenza del miR-302 in linee di cellule tumorali di seno, sia tra linee cellulari diverse, sia separando una sub-popolazione di cellule all'interno della stessa linea in base al fenotipo CD44+ CD24. Questo tipo di indagine, non ha portato ad alcuna rilevazione della presenza del miR302. Alla luce di questo risultato abbiamo scelto due vie per poterci spiegare la presenza del miR-302 in vivo. La prima basata sulla domanda: esistono e quali sono le condizioni cellulari presenti in un tessuto in vivo tali da indurre la ri-espressione ? Da qui abbiamo ricreato in vitro un ambiente esterno che potesse imitare l'ambiente esterno cellulare in vivo. L'altra strategia invece è stato l'utilizzo di un metodo che incrementa la quantità di cellule staminali tumorali, la formazione di mammosfere. Questa duplice strategia si fonda anche sulla osservazione che in ogni caso la presenza del miR-302 in cellule dal fenotipo simil-staminale è a livelli di espressione mai paragonabili a quella presente nelle ES embrionali e questo può anche essere spiegato con un picco di espressione transiente che avviene in un cellule in tempi diversi. Il lavoro di *Mathieu J et al.* (2011) dimostra una convergenza nella *signature* dei *miRNA* tra linee cellulari tumorali ipossiche e linee di hESC indifferenziate. L'ipossia, attraverso HIF, *hypoxia-inducibile factor*, può indurre un programma trascrizionale simile alle cellule staminali

embrionali umane, hESC. E' stata osservata la ri-espressione degli induttori delle cellule staminali pluripotenti (iPSC), *Oct4*, *Nanog*, *Sox2*, *Klf4*, *cMYC* ed il *microRNA-302* in 11 linee cellulari tumorali (prostata, cervello, rene, collo utero, polmone, i tumori del colon, del fegato e della mammella). Abbiamo pertanto dimostrato che in condizioni di stress cellulare, in questo caso di ipossia, la cellula mette in atto dei meccanismi di sopravvivenza e di adattamento ambientali in cui si può osservare la ri-espressione del miR-302b in due diverse linee cellulari, le MDA-MB-231 e le T47D. Abbiamo individuato e descritto le regioni HRE nel promotore del miR302, a conferma di quanto è presente in letteratura, in cui hanno dimostrato il legame tra HIF ed il miR302, attraverso saggi di luciferasi. (*Mathieau J et al.* 2011)

Per poter lavorare con le CSC (spesso descritte come *tumour-initiating cells*), ci sono due ostacoli da dover superare, innanzitutto il fatto che le CSC sono molto in minoranza all'interno di una data popolazione tumorale, e le CSC si riproducono anche molto lentamente. La coltura delle mammosfere è stata ampiamente utilizzata per incrementare il numero di cellule staminali epiteliali mammarie e cellule staminali tumorali (CSC). Abbiamo pertanto utilizzato questo metodo di coltura per seminare cellule della linee MCF7, T47D e MDA-MB-231 in sospensione al fine di ottenere una coltura di mammosfere. Abbiamo eseguito la stessa procedura sia nelle condizioni di normossia, sia nelle condizioni di ipossia. Abbiamo misurato i livelli di espressione dei geni della pluripotenza, *Sox2*, *Nanog* e *Oct4* e del miR-302 b. I dati mostrano induzione del miR-302b insieme ad una significativa induzione di *Sox2*, sia in ipossia, sia in normossia. L'espressione del miR302 si presenta diversa nelle due linee cellulari, mentre nelle T47D il *fold change* tra normossia e ipossia è di 2.86, nelle MDA-MB-231 è di 0.53, quindi nelle MDA-MB-231 sembra esserci una maggiore induzione nelle condizioni di ipossia, cosa che avevamo già osservato dopo 72h di trattamento al 2% di Ossigeno. Allo stesso modo l'espressione di *Oct4* e *Nanog* sono incrementati solo nelle condizioni ipossiche nella linea tumorale T47D, mentre sembra che ci sia induzione di *Nanog* sia in normossia che in ipossia nella linea MDA-MB-231. *O' Leis et al.* hanno confermato che l'espressione di *Sox2* sia sufficiente e necessaria per indurre nelle cellule funzioni *simil-staminali*. (*O' Leis et al.* 2012). Questi dati devono essere ulteriormente confermati.

Nella biologia del cancro, la correlazione tra embriogenesi ed oncogenesi è stato per lungo tempo un tema prevalente. Le cellule tumorali e ESC condividono numerose proprietà biologiche fondamentali, entrambi i tipi cellulari posseggono un ampio

potenziale proliferativo per l' embriogenesi e lo sviluppo del tumore. La pluripotenza è fondamentale per le ESC e dà luogo alla miriade di cellule figlie differenziate presenti nell'embrione maturo (*Visvader JE and Lindeman GJ 2008*). È importante quindi studiare i geni relativi alla pluripotenza associati con l'embriogenesi e la tumorigenesi. I fattori di trascrizione sono critici interruttori molecolari che regolano il destino delle ESC, che possono anche operare nel rinnovo delle cellule tumorali. Questi tre fattori di trascrizione correlati alla pluripotenza, Oct4, Nanog e Sox-2, formano una rete di base di regolazione coordinata che determina il *self-renewal* e la differenziazione delle ESC. Queste molecole coinvolte nel self-renewal delle ESC possono anche contribuire alla tumorigenesi (*Chang CC et al. 2008*). L'espressione non regolata di Oct4, Nanog e Sox-2 è stata dimostrata in numerosi tipi di tumori ed è possibile che questo possa contribuire al processo neoplastico e giocare un ruolo nello sviluppo del cancro. Lo scopo di questo esperimento è stato quello di confermare la presenza di marcatori associati alla pluripotenza nelle linee di cellule umane di cancro al seno nella formazione delle mammosfere, in cui abbiamo osservato anche l'induzione del miR302. Oct4 è un fattore di trascrizione embrionale altamente espresso in cellule di carcinoma, nelle ESC e negli ovociti. Oct4 appartiene alla famiglia dei fattori di trascrizione POU e svolge un ruolo critico nel mantenimento della pluripotenza e self-renewal delle cellule staminali (*Matin MM et al. 2004*). È stato precedentemente proposto che Oct4 agisce come fattore multifunzionale nella biologia del cancro aumentando il potenziale maligno delle ESCs in modo dipendente dalla dose (*Gidekel S et al. 2003; Hochedlinger K et al. 2005*). L'espressione di Oct4 è stato anche dimostrato in alcuni tumori ed è considerato a svolgere un ruolo critico nella tumorigenesi.(*Ezeh UI et al. 2005; Looijenga LH et al. 2003; Chen YC et al. 2008*) Nanog è un fattore di trascrizione recentemente identificato ed è solitamente espresso in ESC. L'espressione costitutiva di Nanog mantiene il fenotipo di cellule staminali consentendo il self-renewal e la propagazione della linea cellulare, anche in presenza di agenti che promuovono la differenziazione. La sovraespressione di Nanog in ESCs umane promuove la pluripotenza ed è associato ad un aumento della capacità di auto-rinnovamento, mentre il silenziamento di Nanog induce la differenziazione in tipi di cellule mature (*Darr H et al. 2006; Zaehres H et al. 2005*). Precedenti studi di Nanog nei tumori hanno suggerito il suo potenziale oncogeno e la regolazione dello sviluppo del tumore (*Wang L et al. 2009; Siu MK et al. 2008 ; Jeter CR et al. 2009*)

Jeter et al hanno rivelato che la *down-regulation* di Nanog ha inibito l'espansione clonale delle cellule MCF7 di carcinoma mammario e lo sviluppo tumorale. Pertanto, l'espressione di Nanog in cellule di carcinoma mammario può correlare con la tumorigenesi del cancro al seno. Sox-2, è uno dei fattori di trascrizione espressi dalle cellule staminali. Vi è una crescente evidenza che suggerisce che questo gene è essenziale per il mantenimento della proliferazione delle cellule staminali e la capacità di differenziazione (*Wilbertz T et al 2012*). L'espressione di Sox-2 è stata osservata nel carcinoma embrionale, teratoma, nel polmone, adenocarcinoma pancreatico e a gastrico (*Santagata S et al. 2007*). *Gui-qin ling et al.* (2012) hanno dimostrato che Sox-2 è espresso in tutte le tre linee di cancro al seno umano cellulari, le cellule MCF7 e T-47D esprimono livelli significativamente più elevati di Sox-2 rispetto a MDA-MB-231 cellule. Questi risultati sono coerenti con un precedente studio di *Chen et al* che individua maggiore espressione della proteina Sox-2 nelle MCF7 e T-47D rispetto alle MDA-MB-231. *Chen et al* hanno ulteriormente dimostrato che la sottoregolazione di Sox-2 utilizzando si-RNA in cellule MCF7 ha mostrato di inibire la proliferazione cellulare e la crescita tumorale. Nel carcinoma mammario, Sox-2 è stato anche dimostrato condurre al fenotipo basal-like e quindi svolgere un ruolo nelle prime carcinogenesi del seno (*Lengerke C et al 2011; Rodriguez-Pinilla SM et al 2007*). Tramite Chromatin ImmunoPrecipitation assay (ChIP) è stato analizzato il legame di Oct4 e Sox2 con questi loci genomici nelle hESCs utilizzando anticorpi specifici per Oct4 e Sox2 e specifici primer che amplificano la regione che circonda il sito di legame ipotizzato; i risultati ottenuti mostrano che Oct4 e Sox2 legano la regione del promotore del miR-302. Ulteriori analisi della sequenza del promotore del miR-302 indicano che a valle del sito di legame di Oct4 e Sox2 c'è anche un sito di legame con Nanog (Figura 9). Questo dato è confermato dai risultati del chromatin immunoprecipitation assay, mediante l'uso di anticorpi specifici per Nanog. Il decremento dell'espressione della proteina Oct4 in corrispondenza del decremento dell'espressione del miR-302 durante il periodo della differenziazione indica che Oct4 agisce come un attivatore trascrizionale del cluster di questo gene. Questi dati necessitano di ulteriori approfondimenti.

Ci sono chiaramente molti vantaggi a lavorare con cellule staminali tumorali derivate da linee cellulari in quanto potrebbero essere dei buoni modelli per capire meglio la biologia delle cellule staminali e per delineare obiettivi terapeutici CSC-specifici. Le complesse interrelazioni che esistono tra le cellule in vivo sono perse quando le linee di cellule sono coltivate su plastica in due dimensioni, ad ogni modo la coltura

bidimensionale rimane ancora il meccanismo maggiormente utilizzato per gli studi in vitro nella ricerca del cancro al seno.

Il tipo di tumore luminal A rappresenta la forma predominante di tumore al seno invasivo (IBC), ed esprime ER α , GATA3 e FOXA1 (*Prat A et al.2010; Bertucci et al. 2009*). Le cellule luminal A mostrano anche gli *hallmark* di organizzazione epiteliale, tra cui i complessi giunzionali intercellulari e la polarità apico-basale. Le cellule Luminal A sono poco invasive o metastatiche, con conseguente prognosi più favorevole nella maggior parte dei pazienti (*Prat A et al.2010; Bertucci et al. 2009*). Tuttavia, i tumori Luminal A possono progredire verso un più alto grado di malignità e formare metastasi. Dei tessuti tumorali di donne analizzati tramite ibridazione in situ la metà delle donne non presentavano evidenza di metastasi al momento della diagnosi, mentre la restante parte aveva riscontrato metastasi linfonodali; tutte le donne avevano subito la resezione del nodo linfatico. La valutazione dell'associazione tra il miR302 e la sopravvivenza totale (overall serviva OS) nei tessuti dei pazienti analizzati ha dato una stima del 75% di sopravvivenza al di sopra dei 5 anni per tessuti miR302 negativi e una stima del 57% per quelli miR-302 positivi. Sebbene non pare ci fosse un legame tra i recettori cellulari ER α , Her2/Neu, PR. Alla luce di quanto osservato, raccolto e descritto in letteratura ci siamo chiesti laddove sia presente il miR-302 quali siano gli effetti esercitati sulla cellula tumorale epiteliale di seno. *Leivonen SK et al.* avevano già descritto che ER α è un target del miR302c, ma l'assenza o i bassi livelli di espressione riscontrati nei tessuti non ha portato ad approfondire lo studio su di esso. Noi abbiamo riconfermato il targeting attraverso saggio di luciferasi per il miR302b, il cui dato è stato ulteriormente validato con esperimenti di mutagenesi, in cui l'espressione della luciferasi non ha subito significativi cambiamenti e western blot.

Il fatto che il miR302 abbia tra i suoi bersagli ER α , conduce alla spiegazione sul perché tumori che non sono aggressivi, subiscono una progressione verso una forma maligna dall'esito peggiore.

La progressione del tumore verso una forma più aggressiva è probabilmente guidata da un sottogruppo di cellule che perdono i vincoli epiteliali ed acquisiscono un fenotipo invasivo mesenchimale attraverso un processo chiamato *transizione epitelio mesenchimale* (EMT). Sono stati identificati diversi fattori epiteliali e luminali antagonisti ai fattori che promuovono gli effetti della EMT. Era rappresenta uno di questi, inoltre stimola l'espressione di GATA3 (*Eeckhoutte J. et al. 2007*) che pure si oppone alla EMT (*Dydensborg AB 2009; Yan W 2010*). ER α interagisce anche con

FOXA1, che è stato visto inibire la EMT nel cancro pancreatico. Abbiamo studiato quindi gli effetti del silenziamento di ER α su GATA3 che si trova relativamente ad esso in un loop positivo in cui GATA3 regola positivamente ER α legandosi sulla regione del promotore del gene (*Kouros-Mehr H et al. 2008; Voduc D et al. 2008; Parikh P. et al. 2005*). ER α a sua volta ha la capacità di stimolare direttamente la trascrizione del gene GATA3 quando viene traslocato nel nucleo, implicando che questi due fattori si trovano in un *loop* di regolazione positivo reciproco. (*Figura 1*) La EMT ha effetto nella diminuzione dell'espressione di proteine giunzionali (ad esempio, *E-caderina*), nella perdita di polarità apico-basale, e nell'acquisizione di un fenotipo mesenchimale con polarità posteriore / anteriore ed nella espressione della *vimentina*. Inoltre, la EMT ha come conseguenza l'acquisizione di un aumento delle capacità invasive e quindi nel formare metastasi. GATA3 si è visto indurre l'espressione di *E-caderina* attraverso motivi di legame sul suo promotore. Mentre il silenziamento di GATA3 attraverso l'uso di SiRNA in cellule MCF-7 hanno innescato la trasformazione fibroblastica e quindi hanno acquisito capacità di invasione cellulare, con conseguente metastasi a distanza. In base a quanto descritto precedentemente sulla correlazione tra la presenza del miR-302 e le metastasi distali, siamo andati a valutare l'espressione di *E-caderina* in cellule MCF7 trasfettate con il pre-miR302b in una coltura transiente, ed abbiamo visto che i livelli di espressione sono sensibilmente minori. Una vasta gamma di fattori extracellulari inducono la EMT, compresi i fattori di crescita, le citochine infiammatorie, l'ipossia e le interazioni cellula-matrice. La EMT è innescata da fattori di trascrizione, compresi i membri delle famiglie di *Snail*, *Twist* e *Zeb*. ER α si oppone alla EMT sopprimendo l'espressione di *Snail 1* e *Snail 2* (*Slug*) (*Ye Y et al. 2010; Fujita et al.2003*).

La EMT conferisce inoltre un'altra peculiarità negativa alle cellule IBC, l'aumento della frazione di cellule staminali tumorali (CSC) (*Mani SA et al. 2008; Creighton C et al. 2010*). La sottopopolazione di CSC conserva il potenziale oncogeno e di *selfrenewal* ed è relativamente insensibile alle terapie antitumorali (*Singh A, Settleman J 2010*). In questo modo la EMT aumenta le metastasi tumorali e la probabilità di recidiva.

Questo processo è recentemente diventato oggetto di molti studi, e le componenti molecolari della EMT potrebbero servire come marcatori prognostici oltre a rappresentare bersagli terapeutici di grande impatto nel cancro al seno invasivo, IBC.

Così, ER α , GATA3 e FOXA1 sembrano avere un ruolo centrale nel mantenimento della differenziazione epiteliale in Luminal IBC, in parte fornendo un *firewall* molecolare alla

progressione EMT. Questo solleva la possibilità che le terapie anti-estrogeni, da un lato riducono la maggior parte dei tumori Luminal A, ma nello stesso tempo potrebbero degradare le misure di salvaguardia contro la EMT. Un secondo meccanismo scoperto di recente che mantiene la differenziazione epiteliale e si oppone alla EMT comprende microRNA, tra cui la famiglia del miR-200, il miR-203 e miR-205 (*Bernardo GM et al. 2010; Taylor et al. 2010*). Questi microRNA hanno come bersaglio mRNA codificante per gli effettori della EMT Zeb1 e ZEB2. Tramite il profilo di espressione avevamo già

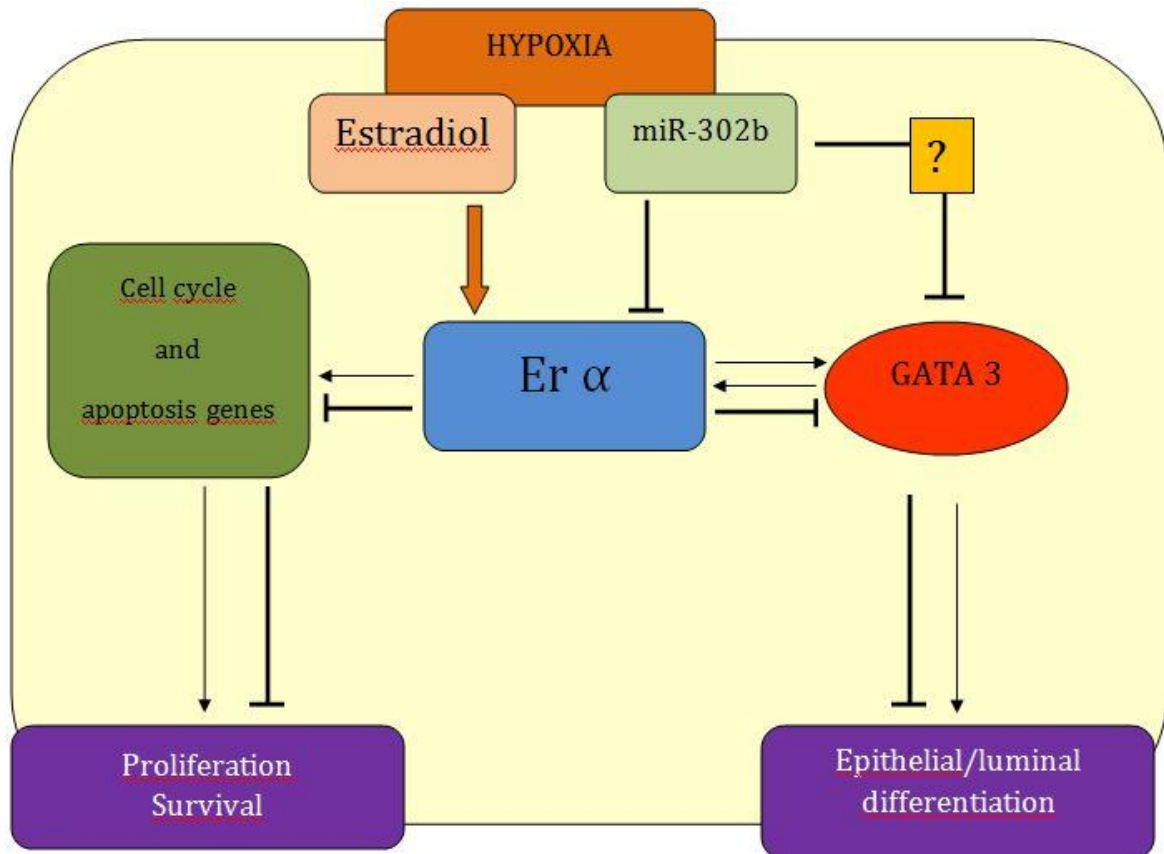


Figura 1.

GATA3 si trova relativamente in un loop positivo con ERα che GATA3 regola positivamente legandosi sulla regione del promotore del gene (Kouros-Mehr H et al. 2008; Voduc D et al. 2008; Parikh P. et al. 2005). ERα a sua volta ha la capacità di stimolare direttamente la trascrizione del gene GATA3 quando viene traslocato nel nucleo, implicando che questi due fattori si trovano in un loop di regolazione positivo reciproco. Il MiR302 silenziando ERα ha effetto anche sui livelli di espressione di GATA 3 e quindi sui grado di differenziamento epiteliale.

identificato che lo squilibrio positivo miR-302/miR-203 (il miR-302 attivo e il miR-203 spento) è una firma identificabile delle cellule staminali pluripotenti. Infatti le cellule pluripotenti analizzate sono caratterizzate da elevati livelli di miR-302 embrionale e dall'assenza del repressore della staminalità miR-203. Quindi anche nel merito della discussione della EMT e del suo ruolo nella formazione di cellule che

acquisiscono proprietà metastatiche, sembra ci possa essere una correlazione inversa tra il miR302 e il miR203. Per indagare sulla effettiva reciprocità negativa dei due miRNA in cellule tumorali di seno abbiamo costruito un vettore contenente il cluster del miR-302, sotto l'azione di un promotore forte ubiquitario (non rappresentato), e l'antisense del miR-203. Un prossimo studio potrebbe essere quello di trasfettare il plasmide in cellule epiteliali tumorali in cui è presente l'espressione del miR203 a livelli apprezzabili, silenziandolo e determinando l'espressione del miR302 esogeno. Questo esperimento potrebbe ulteriormente convalidare l'ipotesi che il miR302 una volta espresso, possa trovarsi in un ciclo di feedback positivo che agisce sulla capacità delle cellule di poter formare metastasi. A ulteriore conferma di quanto descritto, per studiare i meccanismi e poter rispondere a domande che al momento rimangono insolute, abbiamo generato due linee di cellule che esprimono costitutivamente il miR302 nelle T47D, una linea epiteliale e nelle MDA-MB-231, una linea mesenchimale. Da alcune osservazioni svolte (dati non mostrati) ipotizziamo che il miR302 possa essere coinvolto nei reciproci processi di transizione epitelio mesenchimale e viceversa. Come già scritto in precedenza, i meccanismi che stanno alla base della specificità di azione dei miRNA non dipendono solo dal livello della loro espressione, ma anche dal rapporto con i fattori con cui interagiscono. Questo potrebbe spiegare il motivo per cui il solo fenotipo CD44+CD24- di una sub-popolazione di cellule di cancro al seno, non è sufficiente per predire la capacità di attecchimento cellulare per la formazione di metastasi nel polmone. (*Sheridan et al. 2006*). Ulteriori studi saranno svolti su cellule MDA-MB-231. L'espressione transiente del miR302 nelle hESC è da interpretare come dovuta al ruolo di guida cellulare durante le prime fasi della differenziazione piuttosto che connessa con il mantenimento della staminalità, questa peculiarità nelle CSC potrebbe essere interpretata come la capacità del miR302 di innescare meccanismi che conducono ad un fenotipo più aggressivo del tumore perché coinvolto nel grado di differenziamento che può revertire in un senso o nell'altro.

Alla luce di quanto è emerso da questo studio, abbiamo capito che è necessario un approccio diverso per poter rilevare in modo efficiente l'espressione del miR-302 nella singola cellula e non nella massa, così come generalmente misurato dai saggi molecolari. Nel nostro lavoro, abbiamo usato l'ibridazione in situ sui tessuti, ma questa tecnica non può essere efficacemente applicata a cellule vive, e nemmeno utilizzata per il *sorting* cellulare. Per poter approfondire il legame tra il cancro, le cellule staminali e l'attivazione del miR-302 proponiamo quindi un approccio alternativo ed innovativo,

un topo *knock-in* dove solo quelle poche cellule tumorali pro-metastatiche che esprimono il miR-302 sono fluorescenti.

Questo permetterà nuovi approcci sperimentali per lo studio e il trattamento delle cellule staminali tumorali. I topi knock-in esprimeranno il miR-302 co-esprimendo la ZsGreen che sarà sotto il controllo dello stesso promotore. I topi miR-302-ZGreen saranno incrociati con i modelli di cancro al seno che presentano mutazioni nei geni chiave, come Brca2 o Trp53. Questo tipo di studi condurrà, possiamo dire, anche alla conoscenza cinetica del cancro attraverso *imaging in vivo*.

Recentemente si stanno conducendo esperimenti atti a conoscere meglio i meccanismi d'azione e il possibile utilizzo terapeutico di una determinata classe di RNA non codificanti regolatori, i microRNA. I miRNA sono responsabili del silenziamento di più mRNA bersaglio a cui si legano nella regione 3' UTR. Diversi lavori hanno dimostrato che il miR-302 è coinvolto nei meccanismi di rigenerazione cellulare, mantenimento della staminalità e pluripotenza. Il nostro lavoro si è concentrato sullo studio molecolare e funzionale del cluster del miR302, sia in vivo che in vitro. L'espressione del miR-302 è ontogeneticamente e gerarchicamente regolata e l'espressione transiente osservata nelle cellule staminali in differenziamento, è da interpretare come dovuta al ruolo del miR-302 come guida cellulare durante le prime fasi della differenziazione piuttosto che connessa con il mantenimento della staminalità.

Allo stesso tempo l'osservazione della presenza del miR-302 in tessuti tumorali di seno, e lo studio molecolare della ri-espressione del miR-302 in condizioni di ipossia e in condizioni di coltura di mammosfere che ne è seguito, ha condotto all'idea che nella controparte tumorale CSC, la ri-espressione del miR302 potrebbe essere interpretata come la capacità di innesco di meccanismi che conducono ad un fenotipo più aggressivo del tumore perché coinvolto nel grado di differenziamento che può revertire in un senso o nell'altro. Ulteriori indagini saranno svolte per questo obiettivo.

Alla luce di quanto è emerso da questo studio, abbiamo capito che è necessario un approccio diverso per poter rilevare in modo efficiente l'espressione del miR-302 nella singola cellula e non nella massa, così come generalmente misurato dai saggi molecolari. Per poter approfondire il legame tra il cancro, le cellule staminali e l'attivazione del miR-302 proponiamo quindi un approccio alternativo ed innovativo, un topo *knock-in* dove solo quelle poche cellule tumorali pro-metastatiche che esprimono il miR-302 sono fluorescenti.

Questo permetterà nuovi approcci sperimentali per lo studio e il trattamento delle cellule staminali tumorali. I topi knock-in esprimeranno il miR-302 co-esprimendo la ZsGreen che sarà sotto il controllo dello stesso promotore. I topi miR-302-ZGreen saranno incrociati con i modelli di cancro al seno che presentano mutazioni nei geni chiave, come Brca2 o Trp53. Questo tipo di studi condurrà, possiamo dire, anche alla conoscenza cinetica del cancro attraverso *imaging in vivo*.

Colture Cellulari

Le linee cellulari di cancro al seno umano T47D, MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-361, MDA-MB-453, SKBR3, sono state acquistate dalla *American Type Culture Collection* e coltivate in MEM, *Minimum Essential Media*, o DMEM, *Dulbecco's modified Eagle medium*, (Gibco®) contenente 10% di siero fetale bovino (FBS) , 2 mM L-glutamina e 100 U / ml di penicillina-streptomina (Sigma). La linea cellulare non tumorigenica MCF10 è stata coltivata in MEBM, *Mammary Epithelium Basal Medium* (Lonza) con i seguenti supplementi: BPE (*bovine pituitary extract*) 0.4% v/v, hEGF *human epidermal growth factor*, 3 ng/ml, insulina bovina 5 µg/ml, idrocortisone 0.5 µg/ml, GA-1000. (MEGM singlequots kit, Lonza). Per la propagazione delle culture cellulari è stata usata 0.05% tripsina/0.025% EDTA (Invitrogen). Tutte le trasfezioni sono state eseguite con *Lipofectamine 2000* (Invitrogen, Carlsbad, CA) secondo le istruzioni del produttore.

Coltura cellulare in condizioni di ipossia

Per l'induzione in ipossia, le cellule sono state coltivate in un incubatore multigas (Sanyo). Il gas di azoto viene immesso nell'incubatore per indurre una riduzione controllata della percentuale di ossigeno. Le cellule sono stata mantenute per 24, 48, 72 ore alla concentrazione del 2% di O₂ al 5% di CO₂. Trascorso questo tempo abbiamo raccolto lisati proteici ed estratto RNA dai rispettivi campioni.

Coltura di mammosfere

Dopo aver staccato le cellule con tripsina riscaldata a 37°C, ed eseguito dei lavaggi in PBS (*Phosphate Buffered Salin*, Invitrogen) abbiamo ottenuto una singola sospensione cellulare, pipettando delicatamente con una P1000 per 1-3 minuti. Abbiamo seminato 5×10^4 in piastre six wells (*Fisher Scientific, Ultra-Low Attachment plates*) in 3 ml di MammoCult Complete™ Medium (EpiCult) con i seguenti supplementi: Eparina (4 ug/ml), Idrocortisone (0.5 ug/ml), e Pen/Strep. Abbiamo incubato le culture in un incubatore a 37 ° C (condizioni di normossia), e un incubatore al 2% O₂ (condizioni di ipossia) per 7 giorni.

Trattamento con 17β-Estradiolo

Il giorno prima della trasfezione (24h) abbiamo seminato 3.5×10^5 MCF7, MDA-MB-231 e 2.8×10^5 T47D nelle piastre six-well , cresciute in MEM phenol red free (Cellgro) contenente 4% di *charcoal/dextran-treated* siero bovino fetale (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Schema sperimentale

Abbiamo preparato una six well per ogni linea cellulare in duplicato.

Il trattamento ha seguito il seguente schema.

17b-Estradiol	-	-	-	+	+	+
Pre- miR-302b	-	+	-	-	+	-
SiRNA Er-alpha	-	-	+	-	-	+

Pre-miR302b e Scramble (Ambion), SiRNA ed il controllo (Santa Cruz) sono stati aggiunti ad 1ml di mezzo di trasfezione (Optimem, Invitrogen) alla concentrazione finale di 100nmol.

A 24h dalla trasfezione abbiamo trattato le cellule con estradiolo (E2) alla concentrazione finale di 10^{-8} M. Abbiamo raccolto le cellule dopo 24 ore.

Sorting cellulare (FACS)

Le cellule sono state lavate una volta in PBS (*phosphate-buffered saline*, Invitrogen) e raccolte con 0.05% tripsina/0.025% EDTA. Le cellule staccate sono state lavate con PBS contenente l'1% di FBS (*FACS wash Buffer*) e risospese in *wash buffer* (10^6 cells/100 ul). Anticorpi monoclonali fluoro cromo coniugati contro CD44 (BioLegend, FITC) e contro CD24 (BioLegend, PE) o i loro rispettivi isotopi di controllo, sono stati usati in combinazione in aggiunta alla sospensione cellulare alle concentrazioni raccomandate dalle istruzioni del produttore. Abbiamo incubato le cellule in ghiaccio (4°C) al buio per 30'. Le cellule prima lavate nel *wash buffer* sono state risospese in 1 ml e prontamente analizzate.

Generazione di linee cellulari stabili che esprimono miR302b

Uso di lentivirus

Abbiamo generato due linee cellulari stabili che esprimono costitutivamente il miR302b con un sistema di espressione basato sui lentivirus (SBI).

Il kit consta di tre componenti.

- (1) Il vettore di espressione lentivirale
- (2) I plasmidi lentivirali per il packaging
- (3) Una linea cellulare per la produzione delle particelle virali (cellule HEK293TN)

Le cellule della linea tumorale di mammella T47D e le MDA-MB-231 sono state infettate con il miR302b ed il vettore di controllo. Abbiamo estratto DNA plasmidico da sei colonie della piastra fornita dalla casa produttrice (SBI) e abbiamo trasfettato 50×10^5 cellule HEK293A con 500ug di ognuna in una 6-well. Dopo 72 ore abbiamo raccolto le cellule ed estratto RNA per eseguire una RT-PCR di controllo dei livelli di espressione della trasfezione.

Abbiamo piastrato 1.2×10^6 cellule HEK293TN in una piastra 10mm, una per il plasmide contenente il miR-302b e una per il vettore di controllo. Il giorno dopo abbiamo cambiato il mezzo con 9 ml di DMEM 10% FBS senza antibiotico e preparato due mix contenenti una il vettore vuoto di controllo ed una il vettore di espressione virale in aggiunta ai plasmidi per il packaging. Abbiamo eseguito la trasfezione con la *Lipofectamine 2000 TM* in 1 ml di soluzione (DMEM). Dopo 48 ore abbiamo raccolto il surnatante e centrifugato per 15' a 3000g al fine di eliminare i detriti cellulari. 2 ml di PEG 5x (SBI) sono stati aggiunti per precipitare le particelle virali, abbiamo incubato la soluzione a 4°C per 12 ore. Dopo di che abbiamo centrifugato e risospeso il pellet in DMEM, pronto per l'uso.

Abbiamo seminato 6×10^5 cellule nei pozzetti della 6-well, il giorno dopo abbiamo preparato una soluzione contenente DMEM con FBS 10% e Polybrene alla concentrazione finale di 5ug/ml. Per ogni infezione abbiamo usato 300ul di particelle virali. Dopo 12 ore abbiamo rimosso il Polybrene e aggiunto DMEM. A 48 ore dalla trasfezione abbiamo potuto osservare al microscopio a fluorescenza l'espressione della GFP e tramite una RT-PCR abbiamo misurato i livelli di espressione del miR-302b nelle cellule infettate.

Clonaggio pEGFPc1-miR302

La sequenza di 1,58 kb (chr4:113788446-113790025) del cluster del miR-302 umano è stata clonata nell'unico sito di restrizione BglII (Gibco BRL) nel plasmide pEGFPc1 a valle del gene reporter EGFP. L'espressione del cluster è sotto controllo del promotore forte ubiquitario del citomegalovirus (CMV).

Amplificazione del miR-302

In tabella sono riportate le sequenze degli oligonucleotidi disegnati con *flanking sequence tag* per l'enzima di restrizione BglII usati per l'amplificazione del cluster (PCR). L'amplificazione del frammento di PCR è della lunghezza di 1307 bp.

	<i>5'-3' BglIII flanking sequence tag</i>
Reg cons-BglII-A-F:	gaAGATCT-TAGTCAGTCATCTCTGTGGGAAAAG
Rev BglII-A:	gaAGATCT- AATGGCCTGTAGCCAAGAAC

Tabella 1.

Primer forward e reverse, sequenze con aggiunta in 5' del sito di taglio AGATCT dell'enzima di restrizione BglII.

Trasfezione del plasmide pEGFPc1-miR302

Le due linee cellulari utilizzate per la trasfezione sono:

- a) **H1299** conosciute anche con il nome di NCI-H1299: sono una linea cellulare di carcinoma polmonare umano derivante da linfonodi; le cellule sono caratterizzate dalla parziale perdita dell'omozigosi per il gene TP53 e quindi non sono in grado di esprimere la proteina p53 con funzione di oncosoppressore;
- b) **HEK293** sono cellule embrionali umane del rene 293: sono una specifica linea cellulare derivante da cellule umane cresciute in colture di tessuti embrionali renali.

Le cellule sono state selezionate con l'antibiotico G418 alla concentrazione di 1mg/ml, al microscopio a fluorescenza abbiamo identificato e selezionato i cloni stabili, che sono stati propagati in nuove colture.

Plasmide pZsGreen1-1 prom-miR302

La sequenza amplificata dai seguenti primer: *forward* AAAGATTTCTCAAATTGCTTCCAA e *reverse* CGCCGACTTTAGACCACTTG (primer3) del promotore del miR302 murino è stata clonata nel plasmide pZsGreen1-1. Il DNA plasmidico trasformato è stato estratto ed è stata eseguita la trasfezione con lipofectamina in cellule staminali embrionali murine. I cloni sono poi stati selezionati mediante trattamento con l'antibiotico G418, per cui il vettore conferisce resistenza. I cloni selezionati sono stati piccati e lo stesso clone è stato seminato in terreni diversi: su gelatina e su un *feeder layer* di fibroblasti embrionali primari di topo inattivati con mitomicina C.

Saggio di luciferasi e mutagenesi

La regione *seed* putativa del miR-302b nel gene ESR1, contenuta in un frammento di 385bp, è stata clonata nella 3'UTR del gene reporter luciferasi nel vettore pGL3. Inserita nell'unico sito di restrizione XbaI, abbiamo controllato il segmento in reading frame attraverso il sequenziamento della regione. Il costrutto (500ug) è stato trasfettato in cellule HEK293A insieme al Pre-miR302b (100nm) e al plasmide esprime la Renilla (100ug) (normalizzatore). Abbiamo misurato i valori di luce emessa al luminometro e normalizzati con i valori di emissione della Renilla.

Per la mutagenesi abbiamo usato il Kit *QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene) e disegnato i primer dal sito web <http://labtools.stratagene.com/QC>. Abbiamo eseguito una PCR con i primer realizzati, dopo aver analizzato le sequenze abbiamo eseguito la stessa procedura di trasfezione per il saggio di luciferasi precedente.

Western Blot

Le cellule sono state raccolte con lo *scraping* e le proteine sono state estratte con lysis buffer (Ripa Buffer, Inibitori delle proteasi e delle fosfatasi) (Sigma). I lisati sono stati centrifugati 14000rpm x 15' e il surnatante raccolto in nuove eppendorf. Abbiamo eseguito la quantizzazione dei lisati proteici con il metodo Bradford. La quantità di 50 ug/ml di proteina è stata caricata su gel di acrilamide e trasferita su membrana di nitrocellulosa. Le membrane sono state incubate con: anti-GATA3 (Santa Cruz), anti ER- α (Santa Cruz), β -Actina (Santa Cruz).

RT-PCR

L'RNA totale è stato estratto con il kit *RNA Clean-up and Concentration Micro Kit* (Norgen). È stato quantificato al Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Nanodrop technologies). La RT-PCR è stata eseguita con il metodo Taqman. (Applied Biosystems). I dati sono stati normalizzati con OAZ1 e GAPDH per l'espressione genica e RU44 e RU48 per l'espressione dei miRNA. (normalizzatori diversi sono spiegate nelle figure).

Analisi di mRNA Microarray

I dati sono stati analizzati utilizzando il metodo così come descritto da *Liu CG et al. 2008*.

Analisi Statistica

P value sono calcolati con il Test di Student (t-test), i valori sono riportati nelle figure.

MTT, saggio di proliferazione

Abbiamo seminato 20×10^3 cellule della linea tumorale MCF7 e T47D in una 96-well e le abbiamo trasferite in MEM phenol red free. Dopo 48 ore abbiamo trasfettato le cellule con il Pre-miR302b e Scramble (Ambion), SiRNA ed il controllo (Santa Cruz) nel volume finale di soluzione di trasfezione di 100ul. Dopo 24 ore dalla trasfezione, abbiamo trattato le cellule con estradiolo (E2) alla concentrazione finale di 10^{-8} M . Abbiamo cambiato ogni giorno il mezzo, per tre giorni (72h) con MEM phenol red free con e senza Estradiolo per il controllo negativo (Ctr-). Dopo 72 ore abbiamo aggiunto ad ogni pozzetto 20ul della soluzione *CellTiter* (Promega) ed incubato a 37°C approssimativamente per un tempo di 20'. La misura dell'Assorbanza dei campioni alla lunghezza d'onda 490 è stata analizzata e messa in grafico, ponendo in percentuale i valori in riferimento al valore del controllo positivo (Ctr+).

Trangenic Mouse: studi preliminari

Abbiamo clonato una regione di 1974bp del locus del miR-302 nei siti KpnI e BamHI rispettivamente al 5' e al 3' del vettore *pmR-ZsGreen1* (Clontech) ed eseguito la trasfezione del costrutto in cellule HEK293A. La RT-PCR su RNA estratto dai campioni è servita per misurare i livelli di espressione del miR302 ed abbiamo determinato la presenza di espressione della ZsGreen al microscopio a fluorescenza.

Ringraziamenti

Ringraziamenti

Ringrazio il Dott. Stefano Volinia, del Dipartimento di Morfologia ed Istologia, sezione di Istologia, Università degli Studi di Ferrara ed il suo gruppo di ricerca. Il dott. Carlo Maria Croce per avermi dato l'opportunità di poter lavorare nel suo laboratorio di ricerca all'Ohio State University, MVIMG Department, quindi permettendomi l'utilizzo di strumentazioni e materiali. Il suo gruppo di lavoro per la loro disponibilità, ognuno mi ha donato un pezzo di esperienza, nel bene e nel male, di cui io farò tesoro. Ringrazio Marcello Rubino, il tesista che ho seguito nel mio primo anno di dottorato a Ferrara. Ringrazio Marco Galasso che non hai mai esitato di darmi una mano, anche in cose che non riguardavano strettamente la vita di laboratorio. Ringrazio chi mi ha dato la possibilità di collaborare in altri progetti, Stefan Costinean, Alessandro Laganà e Mario Acunzo che va menzionato anche per la pazienza che ha sempre avuto nell'ascoltarmi. Ringrazio Alder Hansjuerg ed i suoi collaboratori per la loro cordialità e disponibilità. Ringrazio Jessica Consiglio, Giulia Romano e Claudia Piovan per il loro aiuto. Alessio Paone per la parte riguardante il FACS.

Bibliografia

- Abdelmohsen K, Srikantan S, Kuwano Y, Gorospe M: **miR-519 reduces cell proliferation by lowering RNA-binding protein HuR levels.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, **105**:20297-20302
- Acconcia, F. et al. **Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol.** *Mol Biol Cell* 16, 231-237 (2005).
- Adams BD, Furneaux H, White BA: **The micro-ribonucleic acid (miRNA) miR-206 targets the human estrogen receptor-alpha (ERalpha) and represses ERalpha messenger RNA and protein expression in breast cancer cell lines.** *Mol Endocrinol* 2007, **21**:1132-1147.
- A. H. J. Scheel, et al. 2009. **Immunofluorescence-based screening identifies germ cell associated microRNA 302 as an antagonist to p63 expression.** *Cell Cycle*; 8:9, 1426-1432.
- Aigner K, Dampier B, Descovich L, Mikula M, Sultan A, Schreiber M, Mikulits W, Brabletz T, Strand D, Obrist P, Sommergruber W, Schweifer N, Wernitznig A, Beug H, Foisner R, Eger A: **The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity.** *Oncogene* 2007, **26**:6979-6988.
- Alessandro Rosa et al. 2009. **The miR-430/427/302 Family Controls Mesendodermal Fate Specification via Species-Specific Target selection.** *Cell*; 16, 517-527.
- Alexandra Drakaki and Dimitrios Iliopoulos. 2009. **MicroRNA Gene Networks in Oncogenesis.** *Current Genomics*; 10, 35-41
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). **Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 3983–3988. doi:10.1073/pnas.0530291100.
- Alicia Barroso-del Jesus, Gema Lucena-Aguilar and Pablo Menendez. 2009. **The miR-302-367 cluster as a potential stemness regulator in ESCs.** *Cell Cycle* 8:3, 394-398;
- Alicia Barroso-delJesus et al. 2008. **Embryonic Stem Cell-Specific miR302-367 Cluster: Human Gene Structure and Functional Characterization of Its Core Promoter.** *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 28, No. 21 p. 6609–6619
- Ambros, V. **The functions of animal microRNAs.** *Nature*, 431: 350-355, 2004
- Anderson E, Clarke RB. **Steroid receptors and cell cycle in normal mammary epithelium.** *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2004; 9:3-13
- Andreas Hans Joachim Scheel, Ulrike Beyer, Reuven Agami and Matthias Döbelstein. 2009. **Immunofluorescence-based screening identifies germ cell associated microRNA 302 as an antagonist to p63 expression.** *Cell Cycle* 8:9, 1426-1432;
- .Ascenzi, P., Bocedi, A. & Marino, M. **Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health.** *Mol Aspects Med* 27, 299-402 (2006).
- Athanasios Zovoilis et al. 2008. **Multipotent adult germline stem cells and embryonic stem cells have similar microRNA profiles.** *Molecular Human Reproduction*
- Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, Baehner FL, Decker T, Eusebi V, Fox SB, Ichihara S, Jacquemier J, Lakhani SR, Palacios J, Rakha EA, Richardson AL, Schmitt FC, Tan PH, Tse GM, Weigelt B, Ellis IO, Reis-Filho JS: **Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists.** *Mod Pathol* 2011, **24**:157-167.
- Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP: **The impact of microRNAs on protein output.** *Nature* 2008, **455**:64-71.
- Baguley BC. **Tumor stem cell niches: a new functional framework for the action of anticancer drugs.** *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2006;1:121-127.
- Bandi N, Zbinden S, Gugger M, Arnold M, Kocher V, et al. 2009. **miR-15a and miR-16 are implicated in cell cycle regulation in a Rb-dependent manner and are frequently deleted or down-regulated in non-small cell lung cancer.** *Cancer Res.* 69(13):5553–59
- Baohong Zhang, Xiaoping Pan, George P. Cobb, Todd A. Anderson. (2007). **microRNAs as oncogenes and tumor suppressors.** *Developmental Biology* 302 1–12
- Battula, V. L., Evans, K. W., Hollier, B. G., Shi, Y., Marini, F. C., Ayyanan, A., et al. (2010). **Epithelial-mesenchymal transition-derived cells exhibit multilineage**

- differentiation potential similar to mesenchymal stem cells*. Stem Cells, 28(8), 1435–1445. doi:10.1002/stem.467.
- Bartel DP: *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. Cell 2009, **136**:215–233.
- Baselga J, Swain SM: *Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3*. Nat Rev Cancer 2009, **9**:463–475
- Basu A, Rowan BG. *Genes related to estrogen action in reproduction and breast cancer*. Front Biosci 2005; **10**:2346–72.
- Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E *mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes*. Genes Dev. 2006 Jul 15; **20**(14):1885–98. Epub 2006 Jun 30.
- Beyer A, Hollunder J, Nasheuer HP, Wilhelm T. *Post-transcriptional expression regulation in the yeast Saccharomyces cerevisiae on a genomic scale*. Mol Cell Proteomics **3**: 1083–1092, 2004
- Biddle A, Mackenzie IC. *Cancer stem cells and EMT in carcinoma* Cancer Metastasis Rev. 2012 Feb 3. [Epub ahead of print]
- Biddle, A., Liang, X., Gammon, L., Fazil, B., Harper, L. J., Emich, H., et al. (2011). *Cancer stem cells in squamous cell carcinoma switch between two distinct phenotypes that are preferentially migratory or proliferative*. Cancer Research. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1059.
- Bjornstrom, L. & Sjoberg, M. *Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes*. Mol Endocrinol **19**, 833–842 (2005).
- Birgersdotter A, Sandberg R, Ernberg I: *Gene expression perturbation in vitro - a growing case for three-dimensional (3D) culture systems*. Semin Cancer Biol 2005, **15**:405–412.
- H.M. Blau, T.R. Brazelton, and J.M. Weimann. 2001. *The Evolving Concept Review of a Stem Cell: Entity or Function?* Cell, Vol. 105, 829–841
- Blenkiron C, Goldstein LD, Thorne NP, Spiteri I, Chin SF, Dunning MJ, Barbosa-Morais NL, Teschendorff AE, Green AR, Ellis IO, Tavaré S, Caldas C, Miska EA: *MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype*. Genome Biol 2007, **8**:R214.
- Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. 2004. *Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs*. RNA **10**(2):185–91
- Bonci D, Coppola V, Musumeci M, Addario A, Giuffrida R, et al. 2008. *The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities*. Nat. Med. **14**(11):1271–77
- Bonnet D, Dick JE. *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. Nat Med 1997; **3**:730–737.
- Borchert GM, Lanier W, Davidson BL: *RNA polymerase III transcribes human microRNAs*. Nat Struct Mol Biol 2006, **13**:1097–1101.
- Bourguet W, Germain P, Gronemeyer H. *Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications*. Trends Pharmacol Sci 2000; **21**:381–8.
- Brabletz, T., Jung, A., Spaderna, S., Hlubek, F., & Kirchner, T. (2005). *Opinion: Migrating cancer stem cells—An integrated concept of malignant tumour progression*. Nature Reviews. Cancer, **5** (9), 744–749. doi:10.1038/nrc1694.
- Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM: *bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila*. Cell 2003, **113**:25–36.
- Calin GA, Croce CM: *MicroRNA signatures in human cancers*. Nat Rev Cancer 2006, **6**:857–866.
- Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo 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 leukemia*. N Engl J Med 2005, **353**:1793–1801.
- Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, Shimizu M, Cimmino A, Zupo S, Dono M, Dell'Aquila ML, Alder

- H, Rassenti L, Kipps TJ, Bullrich F, Negrini M, Croce CM: **MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**:11755-11760.
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, et al. 2002. **Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(24):15524-29
- Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, et al. 2005. **A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia.** *N. Engl. J. Med.* 353(17):1793-801
- Cha ST, Chen PS, Johansson G, Chu CY, Wang MY, Jeng YM, et al. **MicroRNA-519c suppresses hypoxia-inducible factor-1 α expression and tumor angiogenesis.** *Cancer Res.* 2010;70:2675-85.
- Chaffer, C. L., Brennan, J. P., Slavin, J. L., Blick, T., Thompson, E.W., & Williams, E. D. (2006). **Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: Role of fibroblast growth factor receptor-2.** *Cancer Research*, 66(23), 11271-11278. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2044.
- Chalfie M, Horvitz HR, Sulston JE. **Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of *C. Elegans*.** *Cell* 24:59-69, 1981
- Chan SY, Loscalzo J. **MicroRNA-210: a unique and pleiotropic hypoxamir.** *Cell Cycle* 2010;9:1072-83. [CrossRefMedline](#)
- Chang HH, Hemberg M, Barahona M, Ingber DE, Huang S. **Transcriptome-wide noise controls lineage choice in mammalian progenitor cells.** *Nature* 2008;453:544-547.
- Chang CC, Shieh GS, Wu P, Lin CC, Shiau AL and Wu CL: **Oct-3/4 expression reflects tumor progression and regulates motility of bladder cancer cells.** *Cancer Res* 68: 6281-6291, 2008
- Chen YC, Hsu HS, Chen YW, et al: **Oct-4 expression maintained cancer stem-like properties in lung cancer-derived CD133-positive cells.** *PLoS One* 3: e2637, 2008.
- Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, et al. 2005. **TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing.** *Nature* 436(7051):740-44
- Christoffersen NR, Shalgi R, Frankel LB, Leucci E, Lees M, Klausen M, Pilpel Y, Nielsen FC, Oren M, Lund AH: **p53-independent upregulation of miR-34a during oncogene-induced senescence represses MYC.** *Cell Death Differ* 2010, **17**:236-245.
- Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, et al. 2005. **miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102(39):13944-49
- Clarke MF, Fuller M: **Stem cells and cancer: two faces of eve** *Cell* 2006, **124**:1111-1115.
- Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, et al. **Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells.** *Cancer Res* 2006;66:9339-9344.
- Clarke MF, Fuller M. **Stem cells and cancer: two faces of eve.** *Cell* 2006;124:1111-1115.
- Clarke RB, Howell A, Anderson E. **Estrogen sensitivity of normal human breast tissue in vivo and implanted into athymic nude mice: analysis of the relationship between estrogen-induced proliferation and progesterone receptor expression.** *Breast Cancer Res Treat* 1997; 45:121-33.
- Cole KA, Attiyeh EF, Mosse YP, Laquaglia MJ, Diskin SJ, et al. 2008. **A functional screen identifies miR-34a as a candidate neuroblastoma tumor suppressor gene.** *Mol. Cancer Res.* 6(5):735-42
- Constance Ciaudo et al. 2009. **Highly Dynamic and Sex-Specific Expression of microRNAs During Early ES Cell Differentiation.** *PLoS Genetics*
- Covello KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu CJ, et al. **HIF-2 α regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth.** *Genes Dev.* 2006;20:557-70.
- Croce CM: **Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer.** *Nat Rev Genet* 2009, **10**:704-714.
- Dang CV, Kim JW, Gao P, Yustein J. **The interplay between MYC and HIF in cancer.** *Nat Rev Cancer.* 2008;8:51-6.
- Dangi-Garimella S, Yun J, Eves EM, Newman M, Erkland SJ, Hammond SM, Minn AJ, Rosner MR: **Raf kinase inhibitory protein suppresses a metastasis signalling cascade involving LIN28 and let-7.** *EMBO J* 2009, **28**:347-358.

- Darr H, Mayshar Y and Benvenisty N: ***Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features.*** Development 133: 1193-1201, 2006.
- Deborah A. Greer Card et al. (2008). ***Oct4/Sox2-Regulated miR-302 Targets Cyclin D1 in Human Embryonic Stem Cells.*** Molecular and Cellular Biology, Oct. p. 6426–6438
- Debnath J, Brugge JS: ***Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures.*** Nat Rev Cancer 2005, 5:675-688.
- Denger, S. et al. ***ERalpha gene expression in human primary osteoblasts: evidence for the expression of two receptor proteins.*** Mol Endocrinol 15, 2064-2077 (2001).
- Dohadwala M, Yang SC, Luo J, Sharma S, Batra RK, Huang M, Lin Y, Goodglick L, Krysan K, Fishbein MC, Hong L, Lai C, Cameron RB, Gemmill RM, Drabkin HA, Dubinett SM: ***Cyclooxygenase-2-dependent regulation of E-cadherin: prostaglandin E(2) induces transcriptional repressors ZEB1 and snail in non-small cell lung cancer.*** Cancer Res 2006, 66:5338-5345.
- Duax, W.L., Griffin, J.F., Weeks, C.M. & Wawrzak, Z. ***The mechanism of action of steroid antagonists: insights from crystallographic studies.*** J Steroid Biochem 31, 481-492 (1988).
- Dykxhoorn DM, Wu Y, Xie H, Yu F, Lal A, Petrocca F, Martinvalet D, Song E, Lim B, Lieberman J: ***miR-200 enhances mouse breast cancer cell colonization to form distant metastases.*** PLoS ONE 2009, 4:e7181.
- Eiriksdottir G, Johannesdottir G, Ingvarsson S, Björnsdottir IB, Jonasson JG, Agnarsson BA, Yu Z, Wang C, Wang M, Li Z, Casimiro MC, Liu M, Wu K, Whittle J, Ju X, Hyslop T, McCue P, Pestell RG: ***A cyclin D1/microRNA 17/20 regulatory feedback loop in control of breast cancer cell proliferation.*** J Cell Biol 2008, 182:509-517.
- Ezeh UI, Turek PJ, Reijo RA and Clark AT: ***Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma.*** Cancer 104: 2255-2265, 2005.
- Felicetti F, Errico MC, Bottero L, Segnalini P, Stoppacciaro A, et al. 2008. ***The promyelocytic leukemia zinc finger-microRNA-221/-222 pathway controls melanoma progression through multiple oncogenic mechanisms.*** Cancer Res. 68(8):2745–54
- Filippov V, Solovyev V, Filippova M, Gill SS. 2000. ***A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes.*** Gene 245(1):213–21
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N: ***Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?*** Nat Rev Genet 2008, 9:102-114
- Fish JE, Santoro MM, Morton SU, et al. 2008. ***MiR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity.*** Dev Cell 15:272-284.
- Flouriou, G. et al. ***Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function*** EMBO J 19, 4688-4700 (2000).
- Foja S, Jung M, Harwardt B, Riemann D, Pelz-Ackermann O, Schroeder IS. ***Hypoxia Supports Reprogramming of Mesenchymal Stromal Cells Via Induction of Embryonic Stem Cell-Specific microRNA-302 Cluster and Pluripotency-Associated Genes*** Cell Reprogram. 2013 Feb;15(1):68-79. doi: 10.1089/cell.2012.0037. Epub 2012 Dec 20.
- Forman JJ, Legesse-Miller A, Collier HA: ***A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence.*** Proc Natl Acad Sci USA 2008, 105:14879-14884.
- Fornari F, Gramantieri L, Ferracin M, Veronese A, Sabbioni S, et al. 2008. ***MiR-221 controls CDKN1C/p57 and CDKN1B/p27 expression in human hepatocellular carcinoma.*** Oncogene 27(43):5651–61
- Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, Lindow M, Krogh A, Lund AH: ***Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells.*** J Biol Chem 2008, 283:1026-1033.
- Fujimoto N, Jinno N, Kitamura S. ***Activation of estrogen response element dependent transcription by thyroid hormone with increase in estrogen receptor levels in a rat pituitary cell line, GH3.*** J Endocrinol 2004; 181:77-83.
- Galluzzo, P., Caiazza, F., Moreno, S. & Marino, M. ***Role of ERbeta palmitoylation in the inhibition of human colon cancer cell***

- proliferation.** *Endocr Relat Cancer* 14, 153-167 (2007).
- Garofalo M, Di Leva G, Romano G, Nuovo G, Suh SS, et al. 2009. **miR-221&222 regulate TRAIL resi stance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 downregulation.** *Cancer Cell* 16(6):498-509
- Michela Garofalo and Carlo M. Croce. 2010. **microRNAs: Master Regulators as Potential Therapeutics in Cancer;** *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 51:25-43
- Garofalo M, Quintavalle C, Di Leva G, Zanca C, Romano G, et al. 2008. **MicroRNA signatures of TRAIL resistance in human non-small cell lung cancer.** *Oncogene* 27(27):3845-55
- Garzon R, Volinia S, Liu CG, Fernandez-Cymering C, Palumbo T, et al. 2008. **MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia.** *Blood* 111(6):3183-89
- Gaur A, Jewell DA, Liang Y, Ridzon D, Moore JH, Chen C, Ambros VR, Israel MA: **Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines.** *Cancer Res* 2007, **67**:2456-2468.
- George A. Calin and Carlo M. Croce. 2006. **MicroRNA signatures in human cancers.** *Nature reviews*
- Gidekel S, Pizov G, Bergman Y and Pikarsky E: **Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant.** *Cancer Cell* 4: 361-370, 2003.
- Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ: **The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1.** *Nat Cell Biol* 2008, **10**:593-601.
- Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, et al. 2004. **The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs.** *Nature* 432(7014):235-40
- Greither T, Grochola LF, Udelnow A, Lautenschlager C, Wurl P, Taubert H. 2010. **Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival.** *Int. J. Cancer* 126(1):73-80
- Gu, G., Yuan, J., Wills, M., & Kasper, S. (2007). **Prostate cancer cells with stem cell characteristics reconstitute the original human tumor in vivo.** *Cancer Research*, 67(10), 4807-4815. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4608.
- Guo, X., Razandi, M., Pedram, A., Kassab, G. & Levin, E.R. **Estrogen induces vascular wall dilation: mediation through kinase signaling to nitric oxide and estrogen receptors alpha and beta.** *J Biol Chem* 280, 19704-19710 (2005).
- Gupta PB, Chaffer CL, Weinberg RA. **Nat med 2009 Cancer stem cells: mirage or reality?.** *Nat Med* 2009; 5:1010-1012.
- Gupta, P. B., Onder, T. T., Jiang, G., Tao, K., Kuperwasser, C., Weinberg, R. A., et al. (2009). **Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening.** *Cell*, 138(4), 645-659. doi:10.1016/j.cell.2009.06.034.
- Hallgrimsson J, Gudmundsson J, Egilsson V, Sigurdsson H, Barkardottir RB: **Mapping loss of heterozygosity at chromosome 13q: loss at 13q12-q13 is associated with breast tumour progression and poor prognosis.** *Eur J Cancer* 1998, **34**:2076-2081
- Harris AL: **Hypoxia - a key regulatory factor in tumour growth.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**(1):38-47.
- L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, et al. 2007. **A microRNA component of the p53 tumour suppressor network.** *Nature* 447(7148):1130-34
- Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, Rasmussen KE, Jones LP, Assefnia S, Chandrasekharan S, Backlund MG, Yin Y, Khramtsov AI, Bastein R, Quackenbush J, Glazer RI, Brown PH, Green JE, Kopelovich L, Furth PA, Palazzo JP, Olopade OI, Bernard PS, Churchill GA, Van Dyke T, Perou CM: **Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors.** *Genome Biol* 2007, **8**:R76. Ho AS, Huang X, Cao H, ChristmanSkieller C, Bennewith K, Le QT, et al. **Circulating miR-210 as a novel hypoxia marker in pancreatic cancer.** *Transl Oncol* 2010; **3**:109-13.
- Hochedlinger K, Yamada Y, Beard C and Jaenisch R: **Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues.** *Cell* 121: 465-477, 2005
- Hossain A, Kuo MT, Saunders GF: **Mir-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by**

- inhibiting translation of AIB1 mRNA. Mol Cell Biol* 2006, **26**:8191-8201
- Hristo B, Houbaviy, Michael F, Murray, and Phillip A. Sharp. 2003. *Embryonic Stem Cell-Specific MicroRNAs*. *Developmental Cell*, Vol. 5, 351-358
- Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, le Sage C, Nagel R, Nair S, Egan DA, Li A, Huang G, Klein-Szanto AJ, Gimotty PA, Katsaros D, Coukos G, Zhang L, Puré E, Agami R: *The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. Nat Cell Biol* 2008, **10**:202-210.
- Humphreys DT, Westman BJ, Martin DI, Preiss T. **MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Nov 22;102(47):16961-6. Epub 2005 Nov 15.
- Hurteau GJ, Carlson JA, Roos E, Brock GJ: *Stable expression of miR-200c alone is sufficient to regulate TCF8 (ZEB1) and restore E-cadherin expression. Cell Cycle* 2009, **8**:2064-2069.
- Iliopoulos D, Polytaichou C, Hatziapostolou M, Kottakis F, Maroulakou IG, Struhl K, Tsihchlis PN: *MicroRNAs differentially regulated by Akt isoforms control EMT and stem cell renewal in cancer cells. Sci Signal* 2009, **2**:ra62.
- Marilena V. Iorio and Carlo M. Croce. 2009. *MicroRNAs in Cancer: Small Molecules With a Huge Impact*. *J Clin Oncol* ; 27:5848-5856.
- Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM: *MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. Cancer Res* 2005, **65**:7065-7070.
- Jeter CR, Badeaux M, Choy G, et al: *Functional evidence that the self-renewal gene NANOG regulates human tumor development. Stem Cells* 27: 993-1005, 2009
- Jiang J, Lee EJ, Gusev Y, Schmittgen TD: **Real time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines.***Nucleic Acids Res* 2005, **33**:5394-5403.
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ: *RAS is regulated by the let-7 microRNA family. Cell* 2005, **120**:635-647.
- Jordan, V.C., Mittal, S., Gosden, B., Koch, R. & Lieberman, M.E. *Structure-activity relationships of estrogens. Environ Health Perspect* 61, 97-110 (1985).
- Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D, Chambon P. *Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. Science* 1995; 270:1491-4.
- Kato M, Paranjape T, Müller RU, Ullrich R, Nallur S, Gillespie E, Keane K, Esquela-Kerscher A, Weidhaas JB, Slack FJ: *The mir-34 microRNA is required for the DNA damage response in vivo in C. elegans and in vitro in human breast cancer cells. Oncogene* 2009, **28**:2419-2424.
- Keith B, Simon MC. *Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. Cell*. 2007;129:465-72.
- Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, Crowley D, Bronson RT, Jacks T. *Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. Cell* 2005;121:823-835.
- Kiriakidou M, Tan GS, Lamprinaki S, De Planell-Saguer M, Nelson PT, Mourelatos Z. *An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. Cell*. 2007 Jun 15;129(6):1141-51. Epub 2007 May 24.
- Kluiver J, Poppema S, de Jong D, Blokzijl T, Harms G, et al. 2005. *BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. J. Pathol.* 207(2):243-49
- Kong W, Yang H, He L, Zhao J-j, Coppola D, Dalton WS, Cheng JQ: *MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. Mol Cell Biol* 2008, **28**:6773-6784.
- Korpál M, Lee ES, Hu G, Kang Y: *The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. J Biol Chem* 2008, **283**:14910-14914.

- Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, Wentzel EA, Montgomery CL, Hwang HW, Chang TC, Vivekanandan P, Torbenson M, Clark KR, Mendell JR, Mendell JT: *Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model.* *Cell* 2009, **137**:1005-1017.
- Krivtsov AV, Twomey D, Feng Z, Stubbs MC, Wang Y, Faber J, Levine JE, Wang J, Hahn WC, Gilliland DG, Golub TR, Armstrong SA. *Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9.* *Nature* 2006;442:818–822.
- Kuehbacher A, Urbich C, Zeiher AM, et al. 2007. *Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis.* *Circ Res* 101:59-68
- Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T: *Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis.* *Nat Genet* 2007, **39**:673-677.
- Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, Muijtjens M, Jones C, Zehnder JL, Gotlib J, Li K, Manz MG, Keating A, Sawyers CL, Weissman IL. *Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML.* *N Engl J Med* 2004;351:657–667.
- Jesse L Cox and Angie Rizzino. 2010. *Induced pluripotent stem cells: what lies beyond the paradigm shift* *Experimental Biology and Medicine*; 235: 148–158.
- Jinhyung Michael Yi 1, Hyeok Yi Kwon 1, Jung Yoon Cho, Young Joo Lee *Estrogen and hypoxia regulate estrogen receptor alpha in a synergistic manner* *Biochemical and Biophysical Research Communications* 378 (2009) 842–846
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, et al. 2005. *RAS is regulated by the let-7 microRNA family.* *Cell* 120(5):635–47
- Julius Brennecke, Alexander Stark, Robert B. Russell, Stephen M. Cohen. 2005. *Principles of MicroRNA–Target Recognition.* *PLoS Biol* 3(3): e85
- Lal A, Navarro F, Maher CA, Maliszewski LE, Yan N, O'Day E, Chowdhury D, Dykxhoorn DM, Tsai P, Hofmann O, Becker KG, Gorospe M, Hide W, Lieberman J: *miR-24 Inhibits cell proliferation by targeting E2F2, MYC, and other cell-cycle genes via binding to "seedless" 3'UTR microRNA recognition elements.* *Mol Cell* 2009, **35**:610-625
- Lal A, Kim HH, Abdelmohsen K, Kuwano Y, Pullmann R Jr, Srikantan S, Subrahmanyam R, Martindale JL, Yang X, Ahmed F, Navarro F, Dykxhoorn D, Lieberman J, Gorospe M: *p16(INK4a) translation suppressed by miR-24.* *PLoS ONE* 2008, **3**:e1864.
- Lang SH, Frame F, Collins A. *Prostate cancer stem cells.* *J Pathol* 2009; 217:299-306.
- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Cortes JC, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA & Dick JE. *A cell initiating human acute myeloid leukemia after transplantation into SCID mice.* *Nature* 1994;367:645–648.
- Inhan Lee, Subramanian S., Ajay Jong In, Yook Hyun, Sil Kim, Su Hyung ,Hong Nam, Hee Kim, Saravana M. Dhanasekaran, Arul M. Chinnaiyan, and Brian D. Athey *New class of microRNA targets containing simultaneous 59-UTR and 39-UTR interaction sites* *Genome Res.* 2009 July; 19(7): 1175–1183.
- Shintaro Iwasaki, Tomoko Kawamata and Yukihide Tomar *Drosophila Argonaute1 and Argonaute2 Employ Distinct Mechanisms for Translational Repression* *Molecular Cell*, Volume 34, Issue 1, 58-67, 05 2009
- Lee YS, Dutta A. 2007. *The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene.* *Genes Dev.* 21(9):1025–30
- Lee Y, Hur I, Park SY, Kim YK, Suh MR, Kim VN. 2006. *The role of PACT in the RNA silencing pathway.* *EMBO J.* 25(3):522–32
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. *The C. Elegans Eterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14.* *Cell* 75:843-854,1993.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, et al. 2004. *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II.* *EMBO J.* 23(20):4051–60
- Lehmann U, Hasemeier B, Christgen M, Müller M, Römermann D, Länger F, Kreipe H: *Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer.* *J Pathol* 2008, **214**:17-24.
- Lehmann U, Hasemeier B, Christgen M, et al. 2008. *Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer.* *J Pathol* 214:17-24.

- Li Y, Guessous F, Zhang Y, Dipierro C, Kefas B, et al. 2009. *MicroRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes*. *Cancer Res*. 69(19):7569–76
- Lim, L.P., Lau, N.C., Weinstein, E.G., Abdelhakim, A., Yekta, S., Rhoades, M.W., Burge, C.B., and Bartel, D.P. *The microRNAs of Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev*, 17: 991-1008, 2003.
- Leivonen SK, Mäkelä R, Ostling P, Kohonen P, Haapa-Paananen S, Kleivi K, Enerly E, Aakula A, Hellström K, Sahlberg N, Kristensen VN, Børresen-Dale AL, Saviranta P, Perälä M, Kallioniemi O: *Protein lysate microarray analysis to identify microRNAs regulating estrogen receptor signaling in breast cancer cell lines*. *Oncogene* 2009, **28**:3926-3936
- Lengerke C, Fehm T, Kurth R, et al: *Expression of the embryonic stem cell marker SOX2 in early-stage breast carcinoma*. *BMC Cancer* 11: 42, 2011.
- Leo C, Li H, Chen JD. *Differential mechanisms of nuclear receptor regulation by receptor-associated coactivator 3*. *J Biol Chem* 2000; **275**:5976-82.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP: *Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets*. *Cell* 2005, **120**:15-20.
- Levin, E.R. *Plasma membrane estrogen receptors*. *Trends Endocrinol Metab* (2009).
- Li, L., Haynes, M.P. & Bender, J.R. *Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4807-4812 (2003).
- Li, C., Heidt, D. G., Dalerba, P., Burant, C. F., Zhang, L., Adsay, V., et al. (2007). *Identification of pancreatic cancer stem cells*. *Cancer Research*, 67(3), 1030–1037. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2030.
- Licznar A, Caporali S, Lucas A, Weisz A, Vignon F, Lazennec G. *Identification of genes involved in growth inhibition of breast cancer cells transduced with estrogen receptor*. *FEBS Lett* 2003; **553**:445-50.
- Liu CG, Alder H, Calin GA, Ménard S, Croce CM: *MicroRNA signatures in human ovarian cancer*. *Cancer Res* 2007, **67**:8699-8707.
- Locke, M., Heywood, M., Fawell, S., & Mackenzie, I. C. (2005). *Retention of intrinsic stem cell hierarchies in carcinoma-derived cell lines*. *Cancer Research*, 65(19), 8944–8950. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0931.
- Looijenga LH, Stoop H, de Leeuw HP, et al: *POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors*. *Cancer Res* 63: 2244-2250, 2003.
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR: *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. *Nature* 2005, **435**:834838.
- Lv Q, Ye W, et al. Hua Z, Lv Q, Ye W, et al. 2006. *MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia*. *PLoS One* 1:e116
- Lytle JR, Yario TA, Steitz JA: *Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, **104**:9667-9672.
- Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA: *Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer*. *Nature* 2007, **449**:682-688.
- Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. 2007. *Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer*. *Nature* 449:682- 688
- MacGregor JI, Jordan VC. *Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action*. *Pharmacol Rev* 1998; **50**:151-96.
- Mackenzie, I. C. (2008). *Cancer stem cells*. *Annals of Oncology*, 19(Suppl 5), v40–v43. doi:10.1093/annonc/mdn306.
- Mackenzie, I. C. (2006). *Stem cell properties and epithelial malignancies*. *European Journal of Cancer*, 42(9), 1204–1212. doi:10.1016/j.ejca.2006.01.041.
- Mabjeesh NJ, Amir S. *Hypoxia-inducible factor (HIF) in human tumorigenesis*. *Histol Histopathol*.2007;**22**:559–72.
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., et al. (2008). *The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells*. *Cell*, 133(4),
- Marino, M. & Ascenzi, P. *Membrane association of estrogen receptor alpha and*

- beta influences 17beta-estradiol-mediated cancer cell proliferation.* Steroids 73, 853-858 (2008).704–715.
doi:10.1016/j.cell.2008.03.027.
- Mathieu J, Zhang Z, Zhou W, Wang AJ, Heddleston JM, Pinna CM, Hubaud A, Stadler B, Choi M, Bar M, Tewari M, Liu A, Vessella R, Rostomily R, Born D, Horwitz M, Ware C, Blau CA, Cleary MA, Rich JN, Ruohola-Baker H *HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells.* Cancer Res. 2011 Jul 1;71(13):4640-52. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3320. Epub 2011 Jun 28.
- Matin MM, Walsh JR, Gokhale PJ, et al: *Specific knockdown of Oct4 and beta2-microglobulin expression by RNA interference in human embryonic stem cells and embryonic carcinoma cells.* Stem Cells 22: 659-668, 2004.
- Matthay MA, Thiery JP, Lafont F, Stampfer F, Boyer B: *Transient effect of epidermal growth factor on the motility of an immortalized mammary epithelial cell line.* J Cell Sci 1993, 106:869-878.
- Mattie MD, Benz CC, Bowers J, Sensinger K, Wong L, Scott GK, Fedele V, Ginzinger D, Getts R, Haqq C: *Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies.* Mol Cancer 2006, 5:24.
- Meng F, Henson R, Lang M, et al:2006. *Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines.* Gastroenterology 130:2113-2129, 2006
- Mertens-Talcott SU, Chintharlapalli S, Li X, et al. 2007. *The oncogenic microRNA-27a targets genes that regulate specificity protein transcription factors and the G2-M checkpoint in MDA-MB-231 breast cancer cells.* Cancer Res 67:11001-11011.
- Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A. 2004. *High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma.* Genes Chromosom. Cancer 39(2):167–69
- Mayr C, Hemann MT, Bartel DP: *Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation.* Science 2007, 315:1576-1579.
- Miller, W.L. *Molecular biology of steroid hormone synthesis.* Endocr Rev 9, 295-318 (1988).
- Mohyeldin A, Garzon-Muvdi T, Quinones-Hinojosa A. *Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche.* Cell Stem Cell. 2010;7:150–61
- Morgan, J. E., & Partridge, T. A. (2003). *Muscle satellite cells.* The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 35(8),1151–1156.Rodriguez-Pinilla SM, Sarrio D, Moreno-Bueno G, et al: *Sox2: a possible driver of the basal-like phenotype in sporadic breast cancer.* Mod Pathol 20: 474-481, 2007.
- Morrison SJ, Kimble J. *Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer.* Nature 2006 ;441:1068-1074.
- Morrison SJ, Weissman IL. *The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype.* Immunity 1994; 1:661-673
- 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 2006, 25:2537-2545.
- Nilsson, S. et al. *Mechanisms of estrogen action.* Physiol Rev 81, 1535-1565 (2001).
- Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA. *Mechanisms of estrogen action.* Physiol Rev 2001; 81:1535-65.
- O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. *A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice.* Nature 2007;445:106-110.
- O'brien-Jenkins A, Katsaros D, Hatzigeorgiou A, Gimotty PA, Weber BL, Coukos G: *microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer.* Proc Natl Acad Sci USA 2006, 103:9136-9141.
- Olsen PH, Ambros V. *The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in C.elegans by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation.* Dev Biol 216:671-680,1999
- Olsen PH, Ambros V: *The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing inCaenorhabditis elegans by blocking LIN-14*

protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol* 1999, **216**:671-680.

Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. *HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption.* *Cell Metab.* 2006;3:187-97

Pallante P, Visone R, Ferracin M, Ferraro A, Berlingieri MT, et al. 2006. *MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas.* *Endocr. Relat. Cancer* 13(2):497-508

Park SY, Lee JH, Ha M, Nam JW, Kim VN. 2009. *miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 alpha and CDC42.* *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16(1):23-29

Park S-M, Gaur AB, Lengyel E, Peter ME: *The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2.* *Genes Dev* 2008, **22**:894-907

L, Park P and Lin CY: *Characterization of stem cell attributes in human osteosarcoma cell lines.* *Cancer Biol Ther* 8: 543-552, 2009.

Se-Hyung Park, Lydia W. T. Cheung, Alice S. T. Wong, and Peter C. K. Leung Monteiro J, Fodde R. *Cancer stemness and metastasis: therapeutic consequences and perspectives.* *Eur J Cancer.* 2010;46:1198-1203.

Patrawala, L., Calhoun, T., Schneider-Broussard, R., Li, H., Bhatia, B., Tang, S., et al. (2006). *Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells.* *Oncogene*, 25(12), 1696-1708. doi:10.1038/sj.onc.1209327.

Pedram, A., Razandi, M. & Levin, E.R. *Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane.* *Mol Endocrinol* 20, 1996-2009 (2006).

Peinado H, Olmeda D, Cano A: *Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?* *Nat Rev Cancer* 2007, **7**:415-428

Perou CM, Jeffrey SS, van de Rijn M, Rees CA, Eisen MB, Ross DT, Pergamenschikov A, Williams CF, Zhu SX, Lee JC, Lashkari D, Shalon D, Brown PO, Botstein D: *Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers.* *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, **96**:9212-9217.

Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D: *Molecular portraits of human breast tumours.* *Nature* 2000, **406**:747-752.

Petr Svoboda e Matyas Flemr. 2010. *The role of miRNAs and endogenous siRNAs in maternal-to-zygotic reprogramming and the establishment of pluripotency.* European Molecular Biology Organization

Pineau P, Volinia S, McJunkin K, Marchio A, Battiston C, et al. 2009. *miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107(1):264-69

Pulkkinen K, Malm T, Turunen M, et al. 2008. *Hypoxia induces miR-210 in vitro and in vivo ephrin-A3 and neuronal pentraxin 1 are potentially regulated by miR-210.* *FEBS Lett* 582:2397-2401.

Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, Bertrand E, Filipowicz W. *Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells.* *Science.* 2005 Sep 2;309(5740):1573-6. Epub 2005 Aug 4.

Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. *Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression.* *Nature.* 2006;441:437-43.

Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, He X, Perou CM: *Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer.* *Breast Cancer Res* 2010, **12**:R68

Prince, M. E., Sivanandan, R., Kaczorowski, A., Wolf, G. T., Kaplan, M. J., Dalerba, P., et al. (2007). *Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(3), 973-978. doi:10.1073/pnas.0610117104.

Qi L, Bart J, Tan LP, Platteel I, Sluis Tvd, Huitema S, Harms G, Fu L, Hollema H, Berg Avd: *Expression of miR-21 and its targets (PTEN, PDCD4, TMI) in flat epithelial atypia of the breast in relation to ductal carcinoma in situ and invasive carcinoma.* *BMC Cancer* 2009, **9**:163

- Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ. *Efficient tumour formation by single human melanoma cells*. Nature. 2008;456:593–8.
- Razandi, M. et al. *Identification of a structural determinant necessary for the localization and function of estrogen receptor alpha at the plasma membrane*. Mol Cell Biol 23, 1633-1646 (2003).
- Reinhart BJ, Slack FJ, Bassom M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G: *The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans*. Nature 2000, **403**:901-906.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Bassom M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. *The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans*. Nature 403:901-906,2000
- Rene´ F. Ketting. 2009. *Semiconserved Regulation of Mesendoderm Differentiation by microRNAs*. Developmental Cell Previews
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. Nature.2001;414:105–11.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. Nature 2001;414:105–111.
- Roger D. Palmer et al. 2010. *Malignant Germ Cell Tumors Display Common MicroRNA Profiles Resulting in Global Changes in Expression of Messenger RNA Targets*. Tumor and Stem Cell Biology.
- Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, et al. 2008. *MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin*. Nat Biotechnol 26:462-469.
- Russo J, Reina D, Frederick J, Russo IH. *Expression of phenotypical changes by human breast epithelial cells treated with carcinogens in vitro*. Cancer Res 1988; 48:2837-57.
- Russo J, Calaf G, Russo IH. *A critical approach to the malignant transformation of human breast epithelial cells with chemical carcinogens*. Crit Rev Oncog 1993; 4:403-17.
- Russo J, Gusterson BA, Rogers AE, Russo IH, Wellings SR, van Zwieten MJ. *Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis*. Lab Invest 1990; 62:244-78.
- Sage C, Nagel R, Egan DA, Schrier M, Mesman E, et al. 2007. *Regulation of the p27Kip1 tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation*. EMBO J. 26(15):3699–708
- Saito Y, Liang G, Egger G, et al. 2006. *Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells*. Cancer Cell 9:435-443
- Saji S, Jensen EV, Nilsson S, Rylander T, Warner M, Gustafsson JA. *Estrogen receptors alpha and beta in the rodent mammary gland*. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97:337-42.
- Sampson VB, Rong NH, Han J, Yang Q, Aris V, et al. 2007. *MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells*. Cancer Res. 67(20):9762–70
- Santagata S, Ligon KL and Hornick JL: *Embryonic stem cell transcription factor signatures in the diagnosis of primary and metastatic germ cell tumors*. Am J Surg Pathol 31: 836-845, 2007
- Savatier, P., H. Lapillonne, L. A. van Grunsven, B. B. Rudkin, and J. Samarut. 1996. *Withdrawal of differentiation inhibitory activity/leukemia inhibitory factor up-regulates D-type cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in mouse embryonic stem cells*. Oncogene 12:309–322
- Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman ED, Yanaihara N, Yuen ST, Chan TL, Kwong DL, Au GK, Liu CG, Calin GA, Croce CM, Harris CC: *MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma*. JAMA 2008, **299**: 425-436
- Scott GK, Goga A, Bhaumik D, Berger CE, Sullivan CS, Benz CC: *Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b*. J Biol Chem 2007, **282**:1479-1486.
- Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N: *Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs*. Nature 2008, **455**:58-63.
- Sempere, L.F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E., and Ambros, V. *Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in*

- murine and human neuronal differentiation.* Genome Biol, 5: R13, 2004.
- Shi-Lung Lin et al. 2010. *Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state.* RNA Society
- Shi-Lung Li et al. 2010. *Regulation of somatic cell reprogramming through inducible mir-302 expression.* Nucleic Acids Research, 1–12
- Shimono Y, Zabala M, Cho RW, Lobo N, Dalerba P, Qian D, Diehn M, Liu H, Panula SP, Chiao E, Dirbas FM, Somlo G, Pera RA, Lao K, Clarke MF: *Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells.* Cell 2009, **138**:592-603.
- Shimono Y, Zabala M, Cho RW, Lobo N, Dalerba P, Qian D, Diehn M, Liu H, Panula SP, Chiao E, Dirbas FM, Somlo G, Pera RA, Lao K, Clarke MF: *Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with*
- Si M-L, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo Y-Y: *miR-21-mediated tumor growth.* Oncogene 2007, **26**:2799-2803.
- Si ML, Zhu S, Wu H, et al. 2007. *MiR-21-mediated tumor growth.* Oncogene 26:2799-2803
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. *Identification of a cancer stem cell in human brain tumors.* Cancer Res 2003; 63:5821-5828.
- Siu MK, Wong ES, Chan HY, Ngan HY, Chan KY and Cheung AN: *Overexpression of NANOG in gestational trophoblastic diseases: effect on apoptosis, cell invasion, and clinical outcome.* Am J Pathol 173: 1165-1172, 2008.
- Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lonning PE, Brown PO, Borresen-Dale AL, Botstein D. *Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets.* Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100:8418-23.
- Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lønning P, Børresen-Dale AL: *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.* Proc Natl Acad Sci USA 2001, **98**:10869-10874.
- Spaderna S, Schmalhofer O, Wahlbuhl M, Dimmler A, Bauer K, Sultan A, Hlubek F, Jung A, Strand D, Eger A, Kirchner T, Behrens J, Brabletz T: *The transcriptional repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer.* Cancer Res 2008, **68**:537-544.
- Stadler B, Ivanovska I, Mehta K, Song S, Nelson A, Tan Y, et al. *Characterization of microRNAs involved in embryonic stem cell states.* Stem Cells Dev 2010;**19**:935–50.Wang
- Sun F, Fu H, Liu Q, Tie Y, Zhu J, Xing R, Sun Z, Zheng X: *Downregulation of CCND1 and CDK6 by miR-34a induces cell cycle arrest.* FEBS Lett 2008, **582**:1564-1568.
- Shah YM, Rowan BG. *The Src kinase pathway promotes tamoxifen agonist action in Ishikawa endometrial cells through phosphorylation-dependent stabilization of estrogen receptor (alpha) promoter interaction and elevated steroid receptor coactivator 1 activity.* Mol Endocrinol 2005; 19:732-48.
- Stingl, J. (2009). *Detection and analysis of mammary gland stem cells.* The Journal of Pathology, 217(2), 229–241. doi:10.1002/path.2457
- Streuli CH Bailey N, Bissell MJ:** *Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of cell-cell interaction and morphological polarity.* J Cell Biol 1991, **115**:1383-1395.
- Thermann R, Hentze MW. *Drosophila miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation.* Nature 447: 875-878,2007.
- Thiery JP, Aclouque H, Huang RYJ, Nieto MA: *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease.* Cell 2009, **139**:871-890.
- Thomas A. Volpe, et al. 2002 *Regulation of Heterochromatic Silencing and Histone H3 Lysine-9 Methylation by iRNA.* Science 297, 1833
- Tolcher AW, Chi K, Kuhn J, Gleave M, Patnaik A, et al. 2005. *A phase II, pharmacokinetic, and biological correlative study of oblimersen sodium and docetaxel in patients with hormone-refractory prostate cancer.* Clin. Cancer Res. 11(10):3854–61

- Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, et al. 2008 ***Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer.*** *Cancer Res* 68: 4123-4132.
- Tsai WC, Hsu PW, Lai TC, Chau GY, Lin CW, et al. 2009. ***MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma.*** *Hepatology* 49(5):1571-82
- Tavazoie SF, Alarcón C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, Gerald WL, Massagué J: ***Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis.*** *Nature* 2008, **451**:147-152.
- Tay Y, Zhang J, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I: ***MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation.*** *Nature* 2008, **455**:1124-1128.
- Tomari Y, Zamore PD: ***Perspective: machines for RNAi.*** *Genes Dev* 2005, **19**:517-529.
- Valastyan S, Reinhardt F, Benaich N, Calogrias D, Szász AM, Wang ZC, Brock JE, Richardson AL, Weinberg RA: ***A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis.*** *Cell* 2009, **137**:1032-1046.
- Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA: ***Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation.*** *Science* 2007, **318**:1931-1934.
- Vaupel P, Mayer A: ***Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome.*** *Cancer Metastasis Rev* 2007, **26**(2):225-239.
- Ventura A, Jacks T: ***MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way.*** *Cell* 2009, **136**:586-591.
- Visvader JE and Lindeman GJ: ***Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions.*** *Nat Rev Cancer* 8: 755-768, 2008.
- 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 signature of human solid tumors defines cancer gene targets.*** *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, **103**:2257-2261.
- Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, et al. 2006. ***A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets.*** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103(7):2257-61
- Volinia S, Visone R, Galasso M, Rossi E, Croce CM. ***Identification of microRNA activity by Targets' Reverse EXpression.*** *Bioinformatics* (Oxford, England). Jan 1 2010;26(1):91-97
- Wakiyama M, Takimoto K, Ohara O, Yokoyama S. ***Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system.*** *Genes Dev.* 2007 Aug 1;21(15):1857-62.
- Wang, Z., Li, Y., Ahmad, A., Azmi, A. S., Kong, D., Banerjee, S., et al. (2010). ***Targeting miRNAs involved in cancer stem cell and EMT regulation: An emerging concept in overcoming drug resistance.*** *Drug Resistance Updates*, 13(4-5), 109-118. doi:10.1016/j.drug.2010.07.001.
- Welch C, Chen Y, Stallings RL: ***MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells.*** *Oncogene* 2007, **26**:5017-5022.
- Wellner U, Schubert J, Burk UC, Schmalhofer O, Zhu F, Sonntag A, Waldvogel B, Vannier C, Darling D, zur Hausen A, Brunton VG, Morton J, Sansom O, Schüler J, Stemmler MP, Herzberger C, Hopt U, Keck T, Brabletz S, Brabletz T: ***The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs.*** *Nat Cell Biol* 2009, **11**:1487-1495.
- Welte Y, Adjaye J, Lehrach HR, Regenbrecht CR. ***Cancer stem cells in solid tumors: elusive or illusive?.*** *Cell Commun Signal* 2010;8:6.
- Wienholds, E. and Plasterk, R.H. ***MicroRNA function in animal development.*** *FEBS Lett*, 579: 5911-5922, 2005.
- Wilbertz T, Wagner P, Petersen K, et al: ***SOX2 gene amplification and protein overexpression are associated with better outcome in squamous cell lung cancer.*** *Mod Pathol* 24: 944-953, 2011
- Wu L, Fan J, Belasco JG: ***MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA.*** *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, **103**:4034-4039.
- Wu L, Fan J, Belasco JG. ***MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA.*** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Mar 14;103(11):4034-9. Epub 2006 Feb 22.

- Wu XZ. *Origin of Cancer Stem Cells: The Role of Self-Renewal and Differentiation*. *Ann Surg Oncol*. 2008;15:407–414.
- Yamada KM, Cukierman E: *Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D*. *Cell* 2007, 130:601-610.
- Zaehres H, Lensch MW, Daheron L, Stewart SA, Itskovitz-Eldor J and Daley GQ: *High-efficiency RNA interference in human embryonic stem cells*. *Stem Cells* 23: 299-305, 2005
- Yan Q, Bartz S, Mao M, Li L, Kaelin WG Jr.. *The hypoxia-inducible factor 2alpha N-terminal and C-terminal transactivation domains cooperate to promote renal tumorigenesis in vivo*. *Mol Cell Biol* 2007;27:2092–102
- Yi R, Poy MN, Stoffel M, Fuchs E. 2008 *A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'*. *Nature*. 13;452(7184):225-229
- Yu JY, Shcherbata HR, Mathieu J, Wang AJ, Seal S, et al. *MicroRNAs regulate human embryonic stem cell division*. *Cell Cycle* 2009;8:3729–41.
- Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C, Huang Y, Hu X, Su F, Lieberman J, Song E: *let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells*. *Cell* 2007, 131:1109-1123.
- Zhang Z, Sun H, Dai H, Walsh RM, Imakura M, Schelter J, et al. *MicroRNA miR-210 modulates cellular response to hypoxia through the MYC antagonist MNT*. *Cell Cycle* 2009;8:2756–68
- Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. 2004. *Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III*. *Cell* 118(1):57–68
- Zhang, D. & Trudeau, V.L. *Integration of membrane and nuclear estrogen receptor signaling*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 144, 306-315 (2006).
- Zhang S, Balch C, Chan MW, Lai HC, Matei D, Schilder JM, Yan PS, Huang TH, Nephew KP. *Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors*. *Cancer Res* 2008; 68:4311-4320.
- Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, Liang S, Naylor TL, Barchetti A, Ward MR, Yao G, Medina A, Zhao Y, Srivastava D: *A developmental view of microRNA function*. *Trends Biochem Sci* 2007, 32:189-197.
- Zhao, L., O'Neill, K. & Diaz Brinton, R. *Selective estrogen receptor modulators (SERMs) for the brain: current status and remaining challenges for developing NeuroSERMs*. *Brain Res Brain Res Rev* 49, 472-493 (2005)
- Zhong L, D'Urso A, Toiber D, Sebastian C, Henry RE, Vadysirisack DD, et al. *The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1alpha*. *Cell*. 2010;140:280–93
- Zhu S, Si M-L, Wu H, Mo Y-Y: *MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1)*. *J Biol Chem* 2007, 282:14328-14336.
- Zhu S, Wu H, Wu F, Nie D, Sheng S, Mo Y-Y: *MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis*. *Cell Res* 2008, 18:350-359.
- Zito G, Richiusa P, Bommarito A, Carissimi E, Russo L, Coppola A, Zerilli M, Rodolico V, Criscimanna A, Amato M, Pizzolanti G, Galluzzo A, Giordano C. *In vitro identification and characterization of CD133(pos) cancer stem-like cells in anaplastic thyroid carcinoma cell lines*. *PLoS One* 2008;3:e3544.