

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche

Sezione di Istologia ed Embriologia

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOSCIENZE

INDIRIZZO GENETICA E BIOLOGIA MOLECOLARE DELLO SVILUPPO

CICLO XXI

MICRORNA COINVOLTI NELLO SVILUPPO EMBRIONALE E NELLA PROGRESSIONE TUMORALE

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Tullio Pozzan

Supervisore :Ch.mo Prof. Stefano Piccolo

Dottorando : Graziano Martello

*A chi ogni giorno mi sta,
o mi è stato,
vicino.*

INDICE

SOMMARIO GENERALE	7
INTRODUZIONE	9
<i>Cosa sono i microRNA</i>	9
<i>Biogenesi dei microRNA negli animali</i>	9
<i>Meccanismi d'azione dei miRNA</i>	10
<i>Il ruolo biologico di Dicer nello sviluppo embrionale</i>	11
<i>Il segnale TGF-β</i>	12
<i>Prime fasi dello sviluppo in Xenopus laevis</i>	12
<i>L'Organizzatore di Spemann</i>	13
<i>MicroRNA e tumorigenesi</i>	14
<i>MicroRNA e metastasi</i>	15
PARTE A : miR-15 e miR-16 controllano il segnale Nodal durante lo sviluppo embrionale	
SOMMARIO	17
RISULTATI PARTE A	
<i>Il segnale Nodal è regolato da miRNA durante lo sviluppo precoce</i>	19
<i>miR-15/16 regolano ACVR2a, il recettore di Nodal</i>	20
<i>miR-15/16 limitano in segnale Nodal/Activin</i>	21
<i>miR-15/16 stabiliscono le dimensioni dell'Organizzatore di Spemann</i>	22
<i>miR-15/16 sono arricchiti ventralmente</i>	25
<i>Il segnale Wnt inibisce l'espressione di miR-15/16</i>	26
DISCUSSIONE PARTE A	29

PARTE B: miR-103 e miR-107 regolano Dicer a livello post-trascrizionale e promuovono la progressione metastatica

SOMMARIO	31
RISULTATI PARTE B	
<i>L'analisi di espressione di Dicer rivela un inatteso livello di regolazione</i>	33
<i>Identificazione di miR-103/107 come candidati regolatori di Dicer</i>	34
<i>La sovraespressione di miR-103 e miR-107 inibisce l'espressione di Dicer</i>	35
<i>Derivazione di popolazioni cellulari U2OS stabilmente trasdotte e verifica della sovraespressione di miR-103 e miR-107</i>	36
<i>Costruzione di un sensore dell'attività di miR-103 e miR-107 sul 3'UTR di Dicer</i>	36
<i>Verifica della regolazione di miR-103 e miR-107 sul sensore "Dicer 3'UTR Lux"</i>	37
<i>Dicer endogena è un bersaglio di miR-103 e miR-107</i>	37
<i>I miRNA della famiglia mir-103 inducono plasticità epiteliale in cellule HepG2</i>	39
<i>MiRNA della famiglia mir-103 inducono un aumento della capacità migratoria ed invasiva di cellule metastatiche MDA-MB-231</i>	40
<i>Dicer è a valle dell'attività pro-invasiva di miR-103 e miR-107</i>	40
<i>I livelli di Dicer diminuiscono in linee di cellule mammarie tumorali di tipo staminale e/o altamente maligno</i>	41
<i>L'espressione di Dicer è prognostica in pazienti con tumore mammario</i>	42
DISCUSSIONE PARTE B	45
MATERIALI E METODI	53
BIBLIOGRAFIA	67
FIGURE	73

SOMMARIO GENERALE

I microRNA (miRNA) sono una famiglia di piccoli RNA non codificanti, in grado di inibire l'espressione genica a livello post-trascrizionale; i miRNA sono coinvolti in numerosi processi biologici, che vanno dallo sviluppo embrionale al controllo della proliferazione cellulare.

E' interessante osservare come spesso la cellula tumorale utilizzi in maniera aberrante dei programmi genici propri dell'embrione; ad esempio il segnale TGF- β ha un ruolo chiave durante lo sviluppo embrionale precoce, ma nel contesto tumorale regola sia la proliferazione e che l'invasività cellulare.

Nella prima parte (A) di questa tesi di dottorato ci siamo occupati di miR-15 e miR-16, per i quali ho identificato un ruolo durante lo sviluppo embrionale precoce. Abbiamo dimostrato come miR-15 e miR-16 regolino la formazione dell'Organizzatore di Spemann, una struttura che controlla la formazione degli assi corporei e del sistema nervoso in embrioni di *Xenopus laevis* (Martello et al., 2007).

La seconda parte (B) di questa tesi è dedicata ad uno studio, ancora non pubblicato, su una famiglia di miRNA a potenziale attività oncogenica, miR-103 e miR-107. Questi geni sono espressi ad alti livelli in diversi tipi tumorali e sono in grado di controllare la plasticità epiteliale e la motilità cellulare, due aspetti cruciali nel processo metastatico.

MicroRNAs(miRNAs) are small non-coding RNA that regulate gene expression at the posttranscriptional level. MiRNAs are involved in many biological processes, as embryonic development, cellular differentiation and proliferation.

Genes involved in embryonic development are often used aberrantly by cancer cells: for example, the TGF- β cascade has a key role during early development in vertebrates, but during cancer progression TGF- β controls proliferation and invasion.

In the first part of this thesis we characterized miR-15 and miR-16 as microRNAs critical for early embryonic development. Indeed, we demonstrated that they regulate the induction of the Spemann Organizer, a tissue controlling axis formation and neural induction in *Xenopus* embryos (Martello et al., 2007).

The second part of this thesis is about a microRNA family with oncogenic activity: miR-103 and -107 are overexpressed in different tumor types and can control the epithelial plasticity and cellular motility, two main aspects of the metastatic progression.

INTRODUZIONE

Cosa sono i microRNA

I microRNA (miRNA) sono una famiglia di piccoli RNA non-codificanti che rivestono un ruolo importante nella regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica negli eucarioti (Bartel, 2004).

I miRNA partecipano al controllo di un'ampia gamma di processi biologici quali meccanismi di sviluppo embrionale, differenziamento cellulare, apoptosi, controllo della crescita cellulare e regolazione di processi metabolici (He and Hannon, 2004). Non sorprende quindi che i livelli di miRNA siano alterati in processi patologici, primi fra tutti la tumorigenesi e la progressione metastatica (Blenkiron and Miska, 2007; Zhang et al., 2007; Ma and Weinberg, 2008).

Biogenesi dei microRNA negli animali

I microRNA derivano da un primo precursore definito *primary miRNA* (pri-miRNA). I pri-miRNA mostrano origini differenti: alcuni sono introni derivanti dallo splicing di un mRNA; la loro trascrizione è perciò dipendente dalle sequenze promotoriali degli stessi geni-ospiti. Altri sono trascritti a partire dai propri promotori (Figura 1, passaggio 1).

I pri-miRNA sono quindi molecole di RNA a singolo filamento che si ripiegano a formare una parziale doppia elica in seguito all'appaiamento di sequenze complementari. La struttura dei pri-miRNA è quindi quella di una forcina (stem-loop) da cui origineranno i pre-miRNA (Bartel, 2004).

Nel nucleo i pri-miRNA vengono processati a livello della base della "forcina" da una RNA-endonucleasi di tipo III, Drosha. Grazie all'azione di questo enzima, dai pri-miRNA generano i pre-miRNA, strutture "stem-loop" di circa 70 nucleotidi (Figura 1, passaggio

2). In molti casi un singolo pri-miRNA contiene un cluster di diversi microRNA e sarà così responsabile dell'origine di molteplici miRNA.

Il riconoscimento da parte di Drosha necessita dell'interazione di questo enzima con una seconda proteina, Pasha (Partner of Drosha), che riconosce la struttura secondaria della base della "forcina" e sequenze fiancheggianti questa regione, generalmente situate a non più di 125 nucleotidi di distanza (Lee et al., 2003; Yeom et al., 2006).

In seguito i pre-miRNA vengono attivamente traslocati al citoplasma grazie all'azione sinergica di Ran-GTP ed Exportin-5 (Figura 1, passaggio 3)(Bartel, 2004).

Una volta nel citoplasma i pre-miRNA vengono sottoposti all'azione catalitica di un'altra RNA-endonucleasi di tipo III: Dicer. Con questo passaggio i filamenti dei pre-miRNA sono processati nella forma di *duplex* di circa 23 paia di basi (Figura 1, passaggio 4). Queste molecole di RNA a doppia elica vengono indicate come miRNA:miRNA*, in cui miRNA è il filamento che sarà incluso nell'"RNA-Induced Silencing Complex" (RISC); il filamento miRNA* sarà invece degradato (Figura 1, passaggio 5)(Bartel, 2004).

Il RISC è un complesso ribonucleo-proteico composto dal miRNA a singolo filamento e da una varietà di proteine, tra le quali risultano fondamentali per l'attività del complesso le proteine della famiglia Argonaute (Bartel, 2004).

Meccanismi d'azione dei miRNA

Il RISC riconosce l'mRNA bersaglio grazie al miRNA che ha "caricato", infatti vi è una complementarità parziale tra miRNA ed mRNA bersaglio. I siti di legame per i miRNA finora descritti sono situati a livello del 3' UTR (anche se studi recenti hanno dimostrato la presenza di siti di legame per miRNA anche nelle regioni codificanti). L'interazione necessita della formazione di una struttura a doppio filamento tra le basi dalla seconda all'ottava del miRNA, definite "seed", e l'mRNA bersaglio (Bartel, 2004).

Ad oggi sono stati proposti molteplici meccanismi d'azione per i miRNA. Tra i meccanismi più accettati, vanno menzionati il modello dell'“mRNA cleavage” (ovvero della degradazione della molecola di mRNA bersaglio) e quello della “repressione della traduzione” (che non porta a degradazione ma a “stallo” dei ribosomi). Altri meccanismi di repressione includono: inibizione del legame del ribosoma all'mRNA bersaglio, effetti di deadenilazione, di “decapping” dell'mRNA bersaglio o sequestro del messaggero in corpi citoplasmatici definiti “P-Bodies”(Eulalio et al., 2008). Nella scelta tra degradazione o meno del bersaglio, un criterio importante è il grado di complementarità tra miRNA ed mRNA. (Bartel, 2004).

Il ruolo biologico di Dicer nello sviluppo embrionale

Per comprendere il ruolo biologico dei microRNA sono stati effettuati esperimenti di knock-out (delezione a livello genetico) di Dicer, in diversi organismi.

Nei mammiferi Dicer si è dimostrato essenziale per lo sviluppo embrionale. Uno studio ha dimostrato come in embrioni di topo privi di Dicer manchi una corretta definizione degli assi corporei. Questi embrioni presentano una drastica riduzione dei livelli di Oct4, un gene marcatore di staminalità; ciò suggerisce che Dicer è richiesto per sostenere la proliferazione di un pool di progenitori totipotenti (Bernstein et al., 2003).

Il knock-out di Dicer in cellule embrionali staminali (ES-Cells) murine, porta ad una drastica riduzione della loro capacità di differenziamento e di proliferazione. Fatto particolarmente interessante è che in queste cellule è stata evidenziata la riduzione del “silencing” epigenetico a livello centromerico (Kanellopoulou et al., 2005).

Anche in Zebrafish il knock-out di Dicer porta alla formazione di embrioni con difetti dello sviluppo, sebbene, a differenza dei mammiferi, questi difetti appaiono solo a stadi tardivi (Giraldez et al., 2005). Nello specifico la formazione degli assi corporei non viene influenzata, i difetti principali sono a carico del sistema nervoso centrale.

Nel complesso, questi studi mettono in luce il ruolo chiave di Dicer, e quindi dei miRNA, nei processi di sviluppo e differenziamento embrionale.

Il segnale TGF- β

La via di segnale di Transforming Growth Factor- β (TGF- β) occupa un ruolo centrale nel controllo del destino cellulare durante l'embriogenesi e l'omeostasi dei tessuti nell'adulto. Come mostrato in Figura 1b la via di trasduzione di TGF- β è molto semplice: i ligandi TGF- β legano sulla superficie cellulare due recettori dotati di attività serinotreonina chinasi (recettori di tipo I e II) (Wrana et al., 1992). L'interazione tra i due recettori porta all'attivazione, mediante fosforilazione, delle Smad Recettoriale (R-Smad), mediatori intracellulari del segnale. Le R-Smad a questo punto legano Smad4 (definita co-Smad, Lagna et al., 1996) e traslocano al nucleo, dove regoleranno l'espressione di specifici geni bersaglio. Nonostante questa via di segnale sia molto semplice, essa è comunque finemente regolata in maniera spaziale e temporale. Ciò in parte può essere spiegato dalla specificità di interazione tra le proteine che la compongono: ad esempio, nel caso dei ligandi Nodal ed Activin, l'interazione avverrà preferenzialmente con i recettori ACVR1 e ACVR2, i quali a loro volta attiveranno, mediante fosforilazione, la R-Smad chiamata Smad2, che legherà specifiche sequenze sul DNA. Ma la presenza di numerosi ligandi, recettori e Smad, ciascuno con la propria specificità, non può spiegare, ad esempio, come durante lo sviluppo embrionale solamente alcune regioni dell'embrione rispondano ad un certo segnale e non ad un altro, essendo i ligandi TGF- β particolarmente diffusibili: specifici cofattori o regolatori permetteranno di localizzare ed interpretare correttamente i segnali. E' perciò importante lo studio dei meccanismi che controllano il segnale TGF- β .

Prime fasi dello sviluppo in *Xenopus laevis*

Lo *Xenopus laevis* rappresenta una dei modelli d'elezione per lo studio dell'embriologia molecolare, infatti esso offre numerosi vantaggi: ogni femmina può produrre più di 1500

ovociti al giorno; questi si sviluppano velocemente e hanno una dimensione (circa 1mm) che li rende facilmente manipolabili. In breve, lo sviluppo dell'embrione di *Xenopus* è descritto in figura 2a. L'ovocita presenta una simmetria radiale ed è diviso nel dominio animale e vegetale. La fecondazione rompe questa iniziale simmetria, infatti il sito d'ingresso dello spermatozoo sarà il futuro lato ventrale nell'adulto. L'ingresso dello spermatozoo infatti causa un fenomeno chiamato "Rotazione corticale", durante il quale il citoscheletro trasporta e rilocalizza delle vescicole citoplasmatica e altre proteine. Una evidente conseguenza della rotazione corticale è lo spostamento del pigmento, che causa la comparsa di una mezzaluna non pigmentata. Segue una fase di rapida divisione cellulare durante la quale compare una cavità, detta blastocele, che definisce lo stadio di Blastula. E' a questo stadio che i tre foglietti germinativi, ectoderma, mesoderma ed endoderma, sono definiti. Al successivo stadio di Gastrula inizia l'involutione del mesoderma verso l'interno dell'embrione, evidenziando così il labbro dorsale del blastoporo. Questi movimenti morfogenetici permettono il corretto posizionamento dei foglietti germinativi e la formazione degli assi corporei. Allo stadio di Neurula il futuro sistema nervoso viene indotto a livello dell'ectoderma dorsale. Infine allo stadio di Tailbud sono ormai evidenti le strutture della testa, del sistema nervoso e muscolare.

L'Organizzatore di Spemann

I movimenti morfogenetici che avvengono nelle fasi di Gastrula e Neurula, fondamentali per la formazione degli assi corporei e del sistema nervoso, sono opera dell'Organizzatore di Spemann, un tessuto localizzato nel mesoderma dorsale. La fecondazione causa la Rotazione corticale, a cui segue un aumento di segnale Wnt/ β -catenina del futuro lato dorsale (De Robertis et al., 2000; Tao et al., 2005). L'accumulo di β -catenina viene poi tradotto, mediante meccanismi non noti, in un accumulo di segnale Nodal nel lato dorsale dell'embrione a Blastula. Nodal è un ligando TGF- β , il cui legame ai recettori porta all'attivazione, mediante fosforilazione, di una specifica R-Smad,

chiamata Smad2. L'attività di Nodal in questo contesto è l'induzione del mesoderma, ma in particolare alti livelli di Nodal portano alla formazione dell'Organizzatore. Resta quindi una questione aperta il meccanismo mediante il quale l'iniziale asimmetria del segnale Wnt/ β -catenina venga tradotta in una asimmetria di Nodal necessaria alla corretta formazione dell'Organizzatore.

MicroRNA e tumorigenesi

Come spesso è stato dimostrato, geni con un ruolo durante lo sviluppo embrionale vengono poi utilizzati, in maniera aberrante, dalle cellule tumorali.

Anche per alcuni microRNA possiamo dire lo stesso, infatti essi sono stati inizialmente isolati come regolatori dello sviluppo, ma presto è stato dimostrato anche il loro coinvolgimento nella tumorigenesi.

Per alcuni microRNA è stata riconosciuta una funzione come oncosoppressori: per esempio, la regione del cromosoma 13 in cui mappa il cluster di miR-15 e miR-16 risulta deleta in molti casi di leucemia linfocitica cronica (Calin et al., 2002), ma come dimostrato nella Parte A di questa tesi di dottorato, miR-15 e miR-16 hanno anche un ruolo chiave durante le prime fasi dello sviluppo embrionale (Martello et al., 2007). La famiglia di miRNA di let-7, identificata inizialmente in mutanti di *C.elegans* con difetti durante lo sviluppo larvale, ha nell'adulto un ruolo di oncosoppressore, infatti regola l'espressione degli oncogeni K-Ras e c-Myc, e per essa sono stati dimostrati ridotti livelli in tumori di origine polmonare (Johnson et al., 2005).

Tra i miRNA che assumono un ruolo oncogenico si evidenziano i microRNA del cluster mir-17-92, amplificato in forme maligne di linfoma, tra cui il linfoma a cellule B. MiR-21, che agisce sull'oncosoppressore PTEN, ha mostrato un aumento consistente dei suoi livelli in alcuni tipi di tumore (Blenkiron and Miska, 2007).

Numerosi studi hanno evidenziato per i miRNA un'espressione differenziale tra tessuti neoplastici e corrispettivi tessuti sani (Volinia et al., 2006 ; Lu et al., 2005).

E' molto interessante osservare questi studi sul profilo di espressione genica abbiano evidenziato una generale riduzione dei livelli di espressione di miRNA nei tessuti neoplastici rispetto a quelli sani, suggerendo che la biogenesi dei miRNA in generale fosse inibita.

MicroRNA e metastasi

Un aspetto particolarmente rilevante è stata la scoperta che alcuni miRNA siano implicati nei processi di invasività cellulare, plasticità epiteliale e metastasi (Ma and Weinberg, 2008).

Un esempio di come l'aumento dei livelli di un miRNA correli con la presenza di caratteristiche metastatiche è quello di miR-21. Livelli elevati di questo miRNA sono stati riscontrati in forme metastatiche di tumori pancreatici, in glioblastomi e in tumori al seno (Roldo et al., 2006; Chan et al., 2005; Iorio et al., 2005).

Un secondo esempio è quello di miR-373 e miR-520c; un aumento dei livelli di questi miRNA porta all'acquisizione di capacità metastatiche in cellule di tumore della mammella (Huang et al., 2008).

Per altri miRNA è stato invece evidenziato un ruolo come *inibitori* della metastasi: i livelli di miR-335 e miR-126 sono ad esempio ridotti in una frazione particolarmente aggressiva di tumori al seno (Tavazoie et al., 2008). Comportamento analogo è stato dimostrato per un gruppo di 16 miRNA la cui diminuzione dell'espressione correla con caratteristiche di malignità in carcinoma epatocellulare (Budhu et al., 2008).

I meccanismi con cui la disregolazione dell'espressione di miRNA porti all'acquisizione di capacità invasivo-metastatiche sono largamente sconosciuti. Un primo passo avanti in questa direzione è stata la dimostrazione che la famiglia mir-200 sia coinvolta nel

controllo della plasticità epiteliale e nel controllo della transizione epiteliale-mesenchimale (EMT): ridotti livelli di miR-200 causano la perdita di adesione epiteliale e l'aumento della motilità cellulare tipiche di cellule mesenchimali (Burk et al., 2008; Korpál et al., 2008; Gregory et al., 2008; Park et al., 2008).

SOMMARIO PARTE A

miR-15 e miR-16 controllano il segnale Nodal durante lo sviluppo embrionale

I microRNA (miRNA) sono una famiglia di piccoli RNA non codificanti, in grado di inibire l'espressione genica a livello post-trascrizionale (Bartel, 2004); i miRNA sono coinvolti in numerosi processi biologici, che vanno dal differenziamento cellulare al controllo della proliferazione, ma ad oggi resta largamente sconosciuto il loro ruolo come effettori dei fattori di crescita. I ligandi della superfamiglia TGF- β , che include Nodal, Activin e TGF- β 1, sono fondamentali nel patterning embrionale e nell'omeostasi tissutale nell'adulto (Siegel et al., 2003; De Robertis et al., 2000). Essi segnalano mediante una coppia di recettori transmembrana, che a loro volta attivano, mediante fosforilazione, le proteine Smad, mediatrici intracellulari del segnale TGF- β (Siegel et al., 2003). In questa tesi di dottorato viene descritta la identificazione e la caratterizzazione di miR-15/16, i primi miRNA che fungono da regolatori del segnale TGF- β . Durante le prime fasi dello sviluppo embrionale miR-15/16 riducono la risposta a Nodal, un ligando della famiglia TGF- β fondamentale nella formazione dei foglietti germinativi e nell'induzione dell'Organizzatore di Spemann Organizer nella parte dorsale dell'embrione (Niehrs, 2004). miR-15/16 fanno ciò agendo sull'espressione del recettore di Nodal, ACVR2a. Esperimenti condotti in embrioni di *Xenopus laevis* dimostrano come miR-15/16 siano richiesti per limitare l'espressione di geni specifici dell'Organizzatore di Spemann. Il segnale Wnt/ β -catenina inibisce dorsalmente miR-15/16, i quali pertanto risultano arricchiti nel lato ventrale dell'embrione; ciò si traduce dorsalmente in un maggiore livello proteico di ACVR2a e quindi di segnale Nodal. I dati presentati mettono in luce l'importanza dei miRNA nel patterning dell'embrione, agendo all'intersezione di fondamentali segnali cellulari, quali Wnt e TGF- β .

RISULTATI PARTE A

Il segnale Nodal è regolato da miRNA durante lo sviluppo precoce

La domanda a cui ho voluto rispondere all'inizio dello studio qui descritto era la seguente: esistono dei microRNA in grado di regolare le prime fasi dello sviluppo embrionale in *Xenopus*? Questa domanda è lecita perchè gli esperimenti di Knock-out di Dicer in topo e zebrafish suggerivano che i miRNA fossero coinvolti nello sviluppo precoce (vedi Introduzione), e perchè era già noto come alcuni miRNA fossero espressi durante precise fasi dello sviluppo embrionale (Watanabe et al., 2005).

Più nello specifico, ero interessato a sapere che vi fossero miRNA in grado di regolare il segnale Nodal/TGF- β , considerato il ruolo fondamentale di questa via di segnale durante le prime fasi di sviluppo embrionale (vedi Introduzione).

Per valutare se effettivamente vi fossero dei miRNA in grado di controllare il segnale Nodal/TGF- β durante la formazione dei foglietti germinativi ho monitorato l'attività di Nodal in presenza di aumentati livelli dei miRNA endogeni. A questo scopo ho estratto l'RNA totale proveniente da embrioni allo stadio di gastrula, ho isolato la frazione a basso peso molecolare, contenente tutti i miRNA endogeni e ho microiniettato 3ng di questa preparazione insieme all'mRNA di Nodal (*Xnr-1*) in embrioni di *Xenopus* allo stadio di 2 cellule. La risposta a Nodal è stata misurata grazie al plasmide reporter *Mix.2-lux*, in cui il promotore del gene *Mix.2*, un noto bersaglio di Nodal, è stato clonato a monte del gene per la luciferasi (Vize, 1996; Chen et al., 1997): misurando l'attività di luciferasi sarà possibile monitorare l'attività del segnale Nodal. Come mostrato in Figura 3a, embrioni con aumentati livelli di miRNA mostrano una chiara inibizione del segnale Nodal (colonna 2); questo effetto appare specifico poichè l'iniezione di 12ng di una miscela di 172 small-interfering RNA, disegnati contro geni umani, non ha effetto sull'attività di *Mix.2-lux* (colonna 3). Questo esperimento suggerisce quindi che tra i miRNA espressi allo stadio di gastrula ve ne siano alcuni in grado di regolare il segnale Nodal.

miR-15/16 regolano ACVR2a, il recettore di Nodal

E' noto come i miRNA inibiscano l'espressione genica legando l'RNA messaggero bersaglio a livello del 3'UTR; sono disponibili degli strumenti informatici per identificare possibili siti di legame di miRNA nel 3'UTR di un gene d'interesse. Nello specifico ho utilizzato Pictar (Krek et al., 2005) e miRanda (John et al., 2004) per cercare miRNA in grado di inibire geni fondamentali per il segnale Nodal (ovvero i ligandi, i recettori, i fattori di trascrizione Smad o i cofattori nucleari (Massague, 2000)). Al termine di questa analisi ho ottenuto una serie di miRNA candidati, ma tra questi miR-15/16 (Figura 3b) si distinguevano per tre ragioni: i) nel 3'UTR di *ACVR2a*, il recettore di Nodal (Massague, 2000), sono presenti due siti di legame per miR-15/16, suggerendo un legame cooperativo e quindi più efficace (Bartel, 2004); ii) i siti di legame sono conservati evolutivamente dall'uomo agli anfibi (Figura 3c); iii) miR-16 ha alti livelli di espressione durante le prime fasi di sviluppo dello *Xenopus* (Watanabe et al., 2005).

Al fine di verificare l'ipotesi che *ACVR2a* sia un bersaglio di miR-15/16 ho condotto i seguenti esperimenti: per prima cosa ho generato due plasmidi reporter contenenti il gene della luciferasi sotto il controllo di un promotore costitutivo (CMV promoter); nel 3'UTR di questi costrutti ho clonato un sito di legame per miR-15/16, presente originariamente nel 3'UTR di *ACVR2a*, oppure una versione mutata di questo sito di legame, utilizzata come controllo di specificità. (rispettivamente *ACVR2a-wt* e *ACVR2a-mut*, vedi Figura 3d). Ho comparato l'attività di questi due reporter, sia in embrioni di *Xenopus* che in una linea cellulare umana (HepG2), riscontrando che *ACVR2a-wt* ha una ridotta attività di luciferasi rispetto ad *ACVR2a-mut* (Figura 3e, compara colonna 1 e 4): questo risultato suggerisce che gli endogeni miR-15/16 possano reprimere la traduzione di *ACVR2a-wt* agendo sul loro sito di legame predetto. La sovraespressione della forma matura di miR-15, o del precursore primario (pri-miR-15/16) porta ad una ulteriore inibizione dell'attività di *ACVR2a-wt*, senza modificare però l'attività del reporter mutato *ACVR2a-mut*. (Figura 3e, colonne 2 e 3 comparate a 5 e 7). Al contrario, la sovraespressione di una forma mutata di miR-15

(miR-15 MUT), o di un pri-miR di controllo, non ha mostrato alcun effetto su ACVR2a-wt (Figura 3e, colonne 6 e 8). Da questi risultati possiamo concludere che il 3'UTR di *ACVR2a* è un bersaglio di miR-15/16. Infine la sovraespressione di miR-15 causa una riduzione dei livelli proteici endogeni di ACVR2a, senza cambiare i livelli di mRNA (Figura 3f): concludo perciò che miR-15/16 inibiscono *ACVR2a* a livello post-trascrizionale. E' importante sottolineare che i medesimi esperimenti sono stati eseguiti anche in cellule umane HepG2 (Figura 3g e dati non mostrati), ottenendo risultati paragonabili: ad una elevata conservazione evolutiva delle sequenze bersaglio (Figura 3c) sembra corrispondere una conservata attività biologica.

miR-15/16 limitano in segnale Nodal/Activin

Quando i livelli di miR-15/16 sono aumentati ho osservato una diminuzione dei livelli proteici di ACVR2a, è pertanto lecito aspettarsi che anche la risposta a Nodal sia diminuita, essendo ACVR2a il recettore di Nodal. Per testare questa ipotesi ho microiniettato il reporter *Mix.2-lux* insieme a miR-15 maturo, o il precursore pri-miR-15/16, in embrioni di *Xenopus*. Più precisamente la microiniezione è avvenuta nella zona marginale di embrioni allo stadio di 4 cellule, ovvero nella zona dell'embrione con alti livelli di segnale Nodal endogeno (Niehrs, 2004), dalla quale si formerà il mesoderma. Come mostrato in Figura 4a, miR-15/16 inibiscono specificamente il segnale Nodal endogeno. Considerata la elevata conservazione evolutiva di miR-15 e del 3'UTR di ACVR2a ho voluto verificare se miR-15/16 fossero in grado di inibire il segnale di TGF- β anche in cellule umane. A questo scopo ho utilizzato la linea cellulare di epatoma HepG2, nella quale ho trasfettato il reporter CAGA12-lux, in grado di monitorare l'attività di TGF- β in cellule umane. In particolare ho trattato le cellule con la proteina Activin, un altro ligando in grado di segnalare specificamente attraverso ACVR2a, vedendo che essa è in grado di attivare CAGA12-lux (Figura 4b). La sovraespressione di miR-15 inibisce la risposta ad Activin, al contrario la forma mutata non ha effetto (colonne 2 e 1). Se i livelli di ACVR2a vengono aumentati abbiamo un recupero della

riposta ad Activin (Figura 4b, compara colonne 2 e 3); per fare ciò ho trasfettato un cDNA di *ACVR2a* insensibile all'attività di miR-15/16 in quanto privo del 3'UTR. Inoltre l'inibizione di *ACVR2a* con un reagente indipendente (un siRNA specifico per *ACVR2a*) ha lo stesso effetto di miR-15 (Figura 4b, colonne 2 e 5). Da questi risultati posso escludere che l'attività di miR-15/16 sul segnale TGF- β passi attraverso altri geni bersaglio, diversi da *ACVR2a*. Posso quindi concludere che miR-15/16 inibiscono *ACVR2a* causando una conseguente diminuzione del segnale Nodal/Activin.

miR-15/16 stabiliscono le dimensioni dell'Organizzatore di Spemann

Nei vertebrati il segnale Nodal è fondamentale per l'induzione ed il *patterning* del mesoderma (Niehrs, 2004). Prima della gastrulazione un picco di segnale Nodal nel mesoderma dorsale dell'embrione induce l'Organizzatore di Spemann (Agius et al., 2000; Faure et al., 2000; Schohl et al., 2002), un tessuto fondamentale per il controllo dei movimenti morfogenetici della gastrulazione e per la successiva induzione delle strutture anteriori e del sistema nervoso dell'embrione. Al fine di evidenziare il ruolo biologico di miR-15/16 in questi eventi ho condotto degli esperimenti di sovraespressione in *Xenopus*, andando ad analizzare, mediante ibridazione *in situ*, i livelli di espressione di geni bersaglio di Nodal. MiR-15 riduce i livelli di espressione di geni dell'Organizzatore, come *Chordin*, *Pintallavis* e *XAntivin*; inoltre l'induzione del mesoderma viene in parte inibita, come mostrato dalla ridotta espressione del gene *Xbra* (Figura 4c e 4d). In ogni caso l'espressione di *Xbra* non risulta mai azzerata, ma solo ridotta, in embrioni microiniettati con miR-15 e infatti strutture derivanti dal mesoderma, come ad esempio i somiti, si formano in questi embrioni. Tutto ciò è in accordo con il fenotipo di topi in cui è avvenuta un'inattivazione genetica parziale dei recettori *ACVR2* (Song et al., 1999), o con il fenotipo di mutanti ipomorfi di *Nodal* (Niehrs, 2004). Per confermare che l'effetto della sovraespressione di miR-15 passi attraverso una ridotta espressione di *ACVR2a* ho co-iniettato, insieme a miR-15, l'mRNA di *ACVR2a*, osservando un recupero della normale espressione di geni dell'Organizzatore, come *Chordin* e *Pintallavis* (Figura 4c);

anche in questo caso ho utilizzato un mRNA di *ACVR2a* privo del 3'UTR (3' minus), reso quindi insensibile all'effetto dei miRNA. Concludo pertanto che, in embrioni di *Xenopus* allo stadio di gastrula, miR-15 antagonizza il segnale di Nodal agendo a livello del recettore ACVR2a. In accordo con ciò ho osservato che l'attivazione del segnale di Nodal a valle del recettore, ottenuta mediante sovraespressione di Smad2, non è influenzata da miR-15 (Figura 4e).

In seguito ho analizzato embrioni a stadio più avanzato. In un primo momento ho analizzato l'espressione di *Shh* e *Chordin*, in embrioni allo stadio di Neurula. Mediante ibridazione *in situ* ho osservato che la sovraespressione di miR-15 porta alla scomparsa del segmento più anteriore del mesoderma assiale, chiamata piastra precordale (Figura 5a). La piastra precordale è la prima struttura derivante dall'Organizzatore ed è noto che per la sua formazione sono richiesti alti livelli di Nodal. Al contrario, la parte posteriore del mesoderma assiale, chiamata notocorda, richiede livelli di Nodal più bassi ed infatti si forma correttamente anche in embrioni microiniettati con miR-15 (Niehrs, 2004). La piastra precordale ha poi un ruolo chiave nel *patterning* della piastra neurale anteriore: embrioni iniettati con miR-15, essendo privi della piastra precordale dovrebbero mostrare difetti nelle strutture neurali anteriori ed infatti il gene *Pax6*, espresso nell'occhio, è ridotto, così come il marcatore di telencefalo *XBF-1*; anche a livello morfologico la testa di questi embrioni risulta ridotta (Figura 5b). Un ulteriore conseguenza della riduzione delle dimensioni dell'Organizzatore è l'espansione del gene *Sizzled*, espresso nel mesoderma ventrale (Figura 5b).

I dati mostrati fino ad ora sono basati esclusivamente sulla sovraespressione di miR-15/16, pertanto ci dicono solo che questi microRNA *possono* controllare il segnale di Nodal e l'induzione dell'Organizzatore, ma non sappiamo se miR-15/16 endogeni siano *necessari* in questo contesto. Per questo motivo ho condotto degli esperimenti in cui i livelli endogeni di miR-15/16 venivano ridotti utilizzando degli "antimiR". Gli antimiR sono degli RNA lunghi 32 nucleotidi disegnati per essere complementari al miRNA d'interesse: in seguito a trasfezione in cellule umane, o microiniezione in

Xenopus, gli antimiR andranno a legare il miRNA bersaglio, bloccandone l'attività. La presenza di un gruppo metile nel carbonio 2' del ribosio li rende resistenti alle nucleasi endogene e pertanto in grado di inibire l'attività dei miRNA (Krutzfeldt et al., 2006). Ho disegnato due antimiR, uno complementare a miR-15 e l'altro a miR-16 e, negli esperimenti descritti in seguito, ho sempre utilizzato una miscela 1:1 di entrambi, perciò parlerò di antimiR-15/16. Per prima cosa ho verificato se in *Xenopus* questi reagenti potessero inibire l'attività di miR15/16 endogeni, monitorata mediante i reporter ACVR2a-wt e ACVR2a-mut: antimiR-15/16 riduce la repressione di ACVR2a-wt senza influenzare ACVR2a-mut (Figura 6a, compara colonna 4 e 3). Se antimiR-15/16, attraverso l'inibizione di miR-15/16 endogeni, aumenta i livelli di ACVR2a è lecito aspettarsi che anche il segnale di Nodal venga aumentato. Perciò ho misurato l'attività endogena di Nodal mediante il reporter *Mix.2-lux* in embrioni di *Xenopus* iniettati con antimiR-15/16, osservando un marcato aumento del segnale Nodal (Figura 6b). Ciò dimostra che gli endogeni miR-15/16 riducono la risposta a Nodal durante le prime fasi di sviluppo in *Xenopus*.

La sovraespressione di miR-15 riduce la formazione dell'Organizzatore di Spemann, mi sono perciò chiesto se l'inattivazione degli endogeni miR-15/16 avesse l'effetto opposto. Ho iniettato con antimiR-15/16 degli embrioni allo stadio di 4 cellule nella zona marginale, dalla quale originerà il mesoderma e quindi l'Organizzatore. Ho poi raccolto questi embrioni allo stadio di Gastrula e ho visualizzato l'espressione di geni dell'Organizzatore mediante ibridazione *in situ*. Come mostrato in Figura 6c l'inattivazione di miR-15/16 causa una chiara espansione dell'Organizzatore.

Anche se negli esperimenti con antimiR sono sempre stati utilizzati degli antimiR di controllo, è lecito sollevare dei dubbi sulla specificità del loro effetto. Per questa ragione ho ripetuto i medesimi esperimenti con dei reagenti diversi, gli oligonucleotidi Morpholino (MO). I Morpholino sono degli oligonucleotidi sintetici in cui il ribosio è sostituito da una molecola chiamata morpholino, da cui il nome; questa modifica conferisce stabilità al reagente e una bassa tossicità in vivo, infatti i Morpholino sono i

reagenti d'elezione per l'inibizione di uno specifico gene in numerosi animali modello. In particolare sono già stati utilizzati anche per inibire l'attività di microRNA in vivo (Flynt et al., 2007). Ho quindi disegnato dei Morpholino complementari a miR-15 e miR-16, in maniera analoga agli antimiR, che chiamerò da qui in avanti "miR-15/16 MO". In seguito a microiniezione di miR-15/16 MO ho osservato una espansione dei geni dell'Organizzatore allo stadio di Gastrula, come osservato in precedenza con gli antimiR (Figura 7a). Questo effetto è imputabile ad un aumento del segnale Nodal, infatti l'attività del reporter *Mix.2-lux* è aumentata da miR-15/16 MO (Figura 7b). Posso pertanto concludere che le dimensioni dell'Organizzatore di Spemann sono limitate da miR-15/16 in vivo. L'Organizzatore ha un ruolo chiave nell'induzione del tessuto nervoso ed in seguito nella formazione delle strutture anteriori; come mostrato in Figura 7c, miR-15/16 MO causa un'espansione del tessuto neurale, visualizzato mediante il gene *Sox2*, e delle strutture anteriori come l'occhio (*Pax6*) e la ghiandola del cemento (*XAG*).

miR-15/16 sono arricchiti ventralmente

L'Organizzatore di Spemann è indotto da un picco di segnale Nodal nel lato dorsale dell'embrione, che può essere visualizzato come un accumulo di Smad2 fosforilata nel lato dorsale dell'embrione prima della gastrulazione, ossia al momento dell'induzione dell'Organizzatore (Figura 2b e 8a)(Niehrs, 2004; Faure et al., 2000; Schohl et al., 2002). Alcuni ligandi Nodal sono espressi secondo un gradiente dorso-ventrale³ ma comunque il più potente meccanismo per mantenere e potenziare l'espressione di Nodal è il segnale di Nodal stesso, attraverso un meccanismo a feedback positivo a livello trascrizionale (Agius et al., 2000; Pogoda et al., 2000; Cha et al., 2006; Norris et al., 1999). In altre parole l'aumentata espressione di Nodal nel lato dorsale può essere considerata una conseguenza di un precedente sbilanciamento del segnale Nodal (Niehrs, 2004), ma non sappiamo dire quale sia il meccanismo che dà inizio a questa asimmetria. Poiché miR-15 è un regolatore di Nodal, una sua distribuzione diseguale nell'embrione potrebbe causare l'asimmetria del segnale Nodal stesso. Quindi ho misurato i livelli di miR-15/16 maturi

nel lato ventrale e dorsale dell'embrione a stadio di gastrula mediante RT-PCR (Shi et al., 2005), trovandoli arricchiti nel lato ventrale dell'embrione (Figura 8b, in basso). Poi ho comparato l'attività dei reporter ACVR2a-wt and -mut, già usati in precedenza per monitorare l'attività degli endogeni miR-15/16, dopo averli microniettati solo nei blastomeri ventrali o dorsali dell'embrione a 4 cellule: l'attività di miR-15/16 risulta maggiore nel lato ventrale dell'embrione (Figura 8c).

Una distribuzione asimmetrica di miR-15/16 dovrebbe riflettersi in un gradiente complementare della proteina ACVR2a endogena, come sorprendentemente è emerso da un Western Blot su espunti dorsali, laterali e ventrali di embrioni a gastrula (Figura 8d in alto), o da una analisi immunostochimica su sezioni (Figura 8d in basso). Questi dati suggeriscono che miR-15/16, inibendo ventralmente l'espressione proteica di ACVR2a, ne causi un accumulo nel lato dorsale, rendendo le cellule dorsali più sensibili al segnale Nodal. Per validare questa ipotesi ho comparato i livelli di Smad2 fosforilata (p-Smad2), usato come read-out del segnale Nodal, in espunti dorsali e ventrali, da embrioni non trattati o da embrioni iniettati con pri-miR-15/16 o con antimiR-15/16. Come atteso, gli espunti non trattati mostrano un accumulo dorsale di p-Smad2 (Figura 8e), che è perso negli espunti iniettati con miR-15/16 (colonne 1 e 2 comparate a 3 e 4). Al contrario l'inibizione di miR-15 aumenta soprattutto i livelli ventrali di p-Smad2 (colonne 5 e 6). Presi insieme questi risultati suggeriscono un modello in cui il gradiente ventrale di espressione di miR-15/16 impone un gradiente complementare del recettore di Nodal, risultante in un'aumentata risposta a Nodal nel lato dorsale (Figura 8f); questo meccanismo localizza in modo stabile l'Organizzatore di Spemann.

Il segnale Wnt inibisce l'espressione di miR-15/16

In *Xenopus*, il primo evento ad impartire una polarità dorsoventrale è la fecondazione: l'ingresso dello spermatozoo rompe la simmetria dell'ovocita causando un accumulo di segnale Wnt/ β -catenina del futuro lato dorsale (De Robertis et al., 2000; Tao et al., 2005)

(Figura 2b). Questo segnale iniziato da β -catenina viene poi tradotto, mediante meccanismi non noti, in un gradiente di segnale Nodal: embrioni privi del segnale Wnt/ β -catenina perdono l'accumulo dorsale di Smad2 fosforilata (Schohl et al., 2002), e non formano l'Organizzatore (Heasman et al., 1994 e 2000). Dato il ruolo di miR-15/16 nel controllo della risposta a Nodal è lecito ipotizzare che miR-15/16 possa connettere il segnale di Wnt e quello di Nodal. Per verificare questa ipotesi ho quindi monitorato i livelli degli endogeni miR-15/16 in condizioni di aumentato o ridotto segnale Wnt/ β -catenina. La sovraespressione di *Wnt8* o *β -catenina* inibisce l'espressione di miR-15 e miR-16 maturi, e di conseguenza la loro attività monitorata con i reporter ACVR2a-wt e -mut (Figura 9a e 9b). Al contrario, l'iniezione di un inibitore specifico di β -catenina (β cat-MO) aumenta i livelli e l'attività degli endogeni miR-15 e miR-16 (Figura 9c e 9d). È interessante che i trascritti primari di questi miRNA non siano influenzati dal segnale Wnt/ β -catenin (Figura 9e), indicando una regolazione a livello della maturazione e non della trascrizione; ciò è in accordo con la distribuzione omogenea in espianti dorsali e ventrali, del trascritto primario pri-miR15/16 (Figura 8b in alto).

Nelle prime fasi successive alla fecondazione la trascrizione a partire dal genoma zigotico è spenta, inizierà solamente allo stadio di mid-blastula. Pertanto è possibile compiere esperimenti in questa finestra temporale per mettere in luce l'eventuale contributo trascrizionale in un processo d'interesse. Per capire in maggior dettaglio il meccanismo mediante il quale Wnt controlla miR-15/16, ho ripetuto gli esperimenti descritti sopra in assenza di trascrizione zigotica, osservando che Wnt/ β -catenina era ancora in grado di regolare miR-15/16 (Figura 9f). Ciò suggerisce l'interessante ipotesi che questa regolazione sia mediata da un complesso proteico, ereditato dall'ovocita, formato o controllato da β -catenina.

Infine ho valutato se la repressione di β -catenina su miR-15/16 fosse richiesta per la formazione dell'Organizzatore. Per fare ciò ho utilizzato embrioni privati di β -catenina, nei quali l'Organizzatore non si forma e infatti il gene *Chordin* è assente (Figura

9g). Ho quindi iniettato l'antimiR-15/16 in un singolo blastomero, allo scopo di ricreare una zona dell'embrione in cui miR-15/16 fosse represso. Sorprendentemente l'espressione di *Chordin* viene recuperata, suggerendo che miR-15/16 agisca a valle di β -catenina (Fig. 9g). Questi risultati suggeriscono che β -catenina controlli l'intensità e la localizzazione del segnale Nodal attraverso la repressione di miR-15/16 (Figura 9h).

DISCUSSIONE PARTE A

I dati presentati dimostrano che miR-15/16 riducono la traduzione di *ACVR2a*, e di conseguenza inibiscono il segnale Nodal/Activin; miR-15/16 pertanto sono i primi microRNA identificati come regolatori del segnale TGF- β . A differenza di altri regolatori di Nodal, miR-15/16 sono arricchiti nel lato ventrale dell'embrione di *Xenopus*, causando perciò un maggior accumulo dorsale di *ACVR2a* e quindi una maggiore risposta a Nodal. Questa regolazione è necessaria per la corretta formazione e localizzazione dell'Organizzatore di Spemann. E' interessante sottolineare che l'interazione tra miR-15 e *ACVR2a* è conservata dagli anfibi ai mammiferi, infatti ho mostrato che miR-15 inibisce anche la risposta ad Activin in cellule umane. Questa interazione però non è conservata nei pesci, e questo potrebbe spiegare la normale formazione degli assi corporei in embrioni di zebrafish privi di Dicer (Giraldez et al., 2005). Ciò contrasta fortemente con il fenotipo di embrioni di topo in cui Dicer è stato inattivato geneticamente: questi infatti mancano della popolazione staminale pluripotente, da cui l'embrione stesso si genera (Bernstein et al., 2003). E' interessante osservare che miR-15/16 siano tra i miRNA più espressi nelle cellule ES murine (Calabrese et al., 2007), suggerendo un importante ruolo nello sviluppo precoce nei mammiferi.

Uno dei possibili ruoli dei miRNA è quello di mantenere l'identità di un tessuto impedendo la traduzione "illegittima" di RNA messaggeri in un dominio in cui questi dovrebbero essere già repressi a livello trascrizionale (Bartel, 2004). Questo principio però non è applicabile ai tessuti dell'embrione, in cui vi sono popolazioni cellulari pluripotenti, con un destino cellulare "plastico" e talvolta reversibile. Ma miR-15 specifica il destino cellulare con un meccanismo nuovo, ossia creando regioni con diverse quantità di un recettore per un fattore di crescita: in questo modo vi saranno diverse popolazioni cellulari con diverse sensibilità ad un segnale, che si tradurrà in differenti destini cellulari. Inoltre ho mostrato che l'espressione di miR-15/16 è sotto il controllo

negativo di un'altra cascata di segnale fondamentale nello sviluppo embrionale, Wnt/ β -catenina. Ciò permette di rispondere ad una questione aperta da tempo nell'ambito della biologia dello sviluppo, infatti non è mai stato chiarito come la iniziale asimmetria di β -catenina, causata dalla fecondazione, venga poi tradotta in un gradiente di attività di Nodal (De Robertis, 2000; Niehrs, 2004), essenziale per la corretta formazione dell'Organizzatore di Spemann. Il meccanismo molecolare che permette a β -catenina di regolare i livelli di miR-15/16 sarà oggetto di studio in futuro, dai dati qui presentati si può ipotizzare che un complesso proteico ereditato dall'ovocita possa controllare il processamento di questi microRNA. Sono già note infatti delle RNA-binding protein in grado di legare precursori dei miRNA impedendone il processamento (Davis et al., 2008).

E' affascinante ipotizzare che quello qui riportato sia solo un esempio di un meccanismo d'azione più generale, e che quindi altri microRNA possano servire a rompere degli equilibri in popolazioni cellulari omogenee durante lo sviluppo embrionale.

SOMMARIO PARTE B

miR-103 e miR-107 regolano Dicer a livello post-trascrizionale e promuovono la progressione metastatica

I microRNA (miRNA) sono una famiglia di piccoli RNA non codificanti, in grado di inibire l'espressione genica a livello post-trascrizionale. Una proteina fondamentale per la genesi dei miRNA è l'endonucleasi Dicer. In seguito ad analisi bioinformatiche e dati di espressione presenti in letteratura ho ipotizzato che Dicer possa essere oggetto di regolazione da parte dei miRNA della famiglia di miR-107.

Ho pertanto verificato che questa regolazione ha luogo in vivo e ho caratterizzato gli effetti fenotipici della sovraespressione di miR-107: cellule con aumentati livelli di questi miRNA presentano un'aumentata plasticità epiteliale e motilità cellulare, aspetti fondamentali del processo metastatico. In seguito ho verificato che la riduzione dei livelli di Dicer è strumentale a definire questo fenotipo.

Ridotti livelli di Dicer correlano con l'acquisizione di caratteristiche maligne in linee cellulari di mammella e in tumori primari espianati da pazienti; infine ho dimostrato come nella stratificazione di pazienti affetti da tumore di mammella, maggiori livelli di Dicer correlino con una ridotta probabilità di sviluppare metastasi.

RISULTATI PARTE B

L'analisi di espressione di Dicer rivela un inatteso livello di regolazione

Gli enzimi che regolano il metabolismo dei microRNA, quali Dicer e Drosha (vedi introduzione) sono generalmente considerati geni ad espressione ubiquitaria di tipo housekeeping. Una caratteristica di questi geni è quella di avere 3'UTR corte: la tabella 1 mostra che, in media, il 3'UTR di un gene non-housekeeping è lungo 850 bp, ma nel caso di geni ad espressione ubiquitaria (housekeeping) questo valore risulta ridotto di circa 30%.

	Geni Housekeeping	Geni Non-Housekeeping	Dicer
Lunghezza 3'UTR (in bp)	599 ± 30	846 ± 13	4300

Tabella 1: Lunghezza in bp del 3'UTR di geni housekeeping e di geni non-housekeeping; media ± deviazione standard. (Valore di significatività del test statistico, P-Value = 3×10^{-13}) (Eisenberg and Levanon, 2003).

Si pensa che queste ridotte dimensioni siano strumentali a ridurre la probabilità di legame di miRNA che potrebbero controllare l'espressione di questi geni (Eisenberg and Levanon, 2003).

Nonostante Dicer possa essere collocato a pieno titolo tra i geni housekeeping, sorprendentemente il 3'UTR del suo messaggero è costituito da circa 4300 paia di basi, un valore di gran lunga superiore a quello della lunghezza media del 3'UTR di geni appartenenti a questa classe. Questa osservazione apre la possibilità che possano esservi meccanismi di regolazione post-trascrizionale a carico di Dicer.

Ulteriori evidenze rafforzano l'ipotesi dell'esistenza di un controllo sull'espressione di Dicer. Analisi condotte su dati derivanti da microarray, dimostrano un'oscillazione dei livelli d'espressione di Dicer in tessuti umani differenti, probabilmente imputabili a meccanismi di regolazione specifici per ciascun tessuto (Figura 10a). (Ge et al., 2005). Le variazioni dell'espressione di Dicer emergono inoltre anche dal confronto tra un tessuto sano ed il corrispettivo neoplastico; un esempio di ciò è il linfoma di Burkitt riportato in Figura 10b. (Basso et al., 2005).

Identificazione di miR-103/107 come candidati regolatori di Dicer

I dati sopra menzionati sono compatibili con la presenza di meccanismi che regolano l'espressione di Dicer. L'idea che ha attirato la mia attenzione è che Dicer possa essere esso stesso regolato a livello del proprio 3' UTR da microRNA.

Come primo passo per la verifica di questa ipotesi, mi sono avvalso di strumenti bioinformatici, quali Pictar e TargetScan 4.2. Questi programmi forniscono una lista di microRNA candidati alla regolazione di un gene bersaglio. Per fare ciò essi ricercano sequenze complementari a tutti i microRNA noti all'interno del 3'UTR di un gene d'interesse; in seguito, vengono valutati parametri come la stabilità del legame tra il miRNA ed il suo bersaglio e la conservazione evolutiva delle sequenze coinvolte. Questa analisi fornisce una "classifica" dei miRNA candidati.

Dai risultati ottenuti ho notato che, tra i microRNA potenziali regolatori del messaggero di Dicer, i microRNA della famiglia mir-103 (vedi tabella 2) emergevano come candidati particolarmente interessanti. Nel 3' UTR di Dicer si contano infatti ben 8 siti indipendenti per miR-103/107 (Figura 10c). Va ricordato che la presenza di siti bersaglio multipli per uno stesso miRNA è tipicamente un indice di maggiore affidabilità e rilevanza nella predizione di bersaglio in quanto l'effetto biologico del legame di microRNA ad un messaggero opera in modo cooperativo (Bartel, 2004).

Come ulteriore criterio, ho valutato la conservazione evolutiva, un ovvio indice di rilevanza biologica. I siti di legame per miR-103/107 presentano un notevole grado di

conservazione tra specie differenti, suggerendo un'importante funzione biologica per queste sequenze (Figura 10c).

microRNA	sequenza del maturo
hsa-miR-103.1	5' -agcagcauuguacagggcuauga-3'
hsa-miR-103.2	5' -agcagcauuguacagggcuauga-3'
hsa-miR-107	5' -agcagcauuguacagggcua <u>g</u> a-3'

Tabella 2: la famiglia di miRNA di miR-103 è composta da 3 miRNA codificati a partire da diversi loci genici. miR-107 differisce dagli altri membri per un solo nucleotide al 3'.

La sovraespressione di miR-103 e miR-107 inibisce l'espressione di Dicer

In prima istanza, mi sono chiesto quali potessero essere gli effetti di una sovraespressione di miR-103 e miR-107. A tal fine ho generato dei vettori retrovirali chiamati “MirVec-103” e “MirVec-107” (le mappe dei costrutti sono riportate in Figura 10d), nei quali è stato clonato un frammento di 600bp di DNA genomico contenente i precursori di miR-103 o miR-107.

La scelta di amplificare regioni genomiche di 600 paia di basi, contenenti le sequenze dei pri-miRNA, garantisce il mantenimento di condizioni le più simili possibili a quelle fisiologiche per la biogenesi dei miRNA. Infatti è stato dimostrato che in questo modo si riescono ad ottenere alti livelli di miRNA maturo correttamente processato (Chen et al., 2004).

Analogamente sono stati derivati due vettori di controllo, chiamati “MirVec-shGFP” e “MirVec-154”. Il primo codifica per shGFP (che darà origine ad un siRNA diretto contro GFP, un gene assente nelle cellule umane) e il secondo per miR-154 (un microRNA non candidato alla regolazione di Dicer).

Derivazione di popolazioni cellulari U2OS stabilmente trasdotte e verifica della sovraespressione di miR-103 e miR-107

I vettori sopra descritti sono stati utilizzati per la trasduzione di cellule U2OS (osteosarcoma umano), come descritto nei Materiali e Metodi. Ho quindi ottenuto linee cellulari in grado di esprimere stabilmente i diversi costrutti, le quali d'ora in avanti saranno chiamate "U2OS-miR-103", "U2OS-miR-107", "U2OS-shGFP" e "U2OS-miR-154". Mi sono chiesto se nelle linee "U2OS-miR-103" e "U2OS-miR-107" si assistesse ad un effettivo aumento dei livelli di miRNA maturo, rispetto alle linee di controllo. A questo scopo ho utilizzato la tecnologia della Real-Time qPCR con sonde TaqMan. Ho comparato, ad esempio, i livelli di miR-103 misurati nelle linee "U2OS-miR-103" rispetto alla linea "U2OS-miR-154". Non ho utilizzato come controllo delle cellule U2OS non trasdotte, in quanto il processo di trasduzione potrebbe influenzare aspecificamente i livelli di miRNA endogeni.

I risultati della quantificazione per Real-time qPCR di miR-103 (normalizzati ai livelli di snRNA U6), sono quelli riportati in Figura 10e: si apprezza una quantità di miR-103 nove volte superiore nelle "U2OS-miR-103" rispetto a quella delle "U2OS-miR-154".

Ad ulteriore ed importante riconferma, risultati analoghi sono stati ottenuti per miR-107 nella linea "U2OS-miR-107" (dati non mostrati).

Questa serie di esperimenti mi ha così permesso di ottenere linee cellulari che sovraesprimono miR-103 e miR-107. Queste sono state utilizzate per verificare la presenza di un'attività regolativa di questi miRNA sull'espressione di Dicer.

Costruzione di un sensore dell'attività di miR-103 e miR-107 sul 3'UTR di Dicer

Al fine di monitorare l'attività di miR-103 e miR-107 sulla stabilità/traducibilità del messaggero di Dicer, ho clonato il 3'UTR di Dicer umano a valle del gene per la luciferasi (Figura 11a). A questo scopo ho utilizzato il vettore pCS300-lux, che contiene il gene della luciferasi posto sotto il controllo di un promotore costitutivo (*Citomegalovirus promoter*, "CMV"). La sequenza del 3'UTR di Dicer è stata amplificata

per PCR a partire da cDNA di cellule umane, grazie all'utilizzo di primers specifici, ed è stata clonata in pCS300-lux nel *Multiple Cloning Site* a valle dell'ORF della luciferasi.

Il procedimento fino a qui seguito ci ha permesso di ottenere un costrutto ("Dicer 3'UTR Lux", Figura 11a) che serve da sensore nella rilevazione di eventuali attività regolative di microRNA sul 3'UTR di Dicer.

Verifica della regolazione di miR-103 e miR-107 sul sensore "Dicer 3'UTR Lux"

Al fine di verificare la capacità di miR-103 e miR-107 di agire sul trascritto di Dicer, le linee cellulari "U2OS-miR-103", "U2OS-miR-107", "U2OS-shGFP" e "U2OS-miR-154" sono state trasfettate transientemente con il sensore "Dicer 3'UTR Lux" ed, in parallelo, con pCS300-lux vuoto ("Control Lux"). Come "normalizzante" ho quindi trasfettato assieme a "Dicer 3'UTR Lux" o "Control Lux" anche un plasmide che permette l'espressione del gene LacZ, codificante la proteina β -galattosidasi batterica, la cui attività può essere rilevata mediante un semplice saggio colorimetrico.

I risultati del saggio di luciferasi ottenuti sono riportati in Figura 11b: l'attività di "Control lux" non varia in maniera significativa nelle diverse linee cellulari, mentre l'attività del sensore "Dicer 3'UTR Lux" è ridotta drasticamente in tutte le linee cellulari, suggerendo l'esistenza di una regolazione a carico del 3'UTR di Dicer da parte di miRNA endogeni (figura 11b, compara colonne 1-2 con 5-6). Nelle linee sovraesprimenti miR-103 e miR-107 vi è un'ulteriore riduzione dell'attività del sensore (colonne 7 e 8 rispetto a 5 e 6). Ciò dimostra che miR-103 e miR-107 sono strumentali alla regolazione del 3'UTR di Dicer.

Dicer endogena è un bersaglio di miR-103 e miR-107

Alla luce dei risultati ottenuti attraverso il sensore artificiale "Dicer 3'UTR Lux", ho voluto verificare direttamente se miR-103 e miR-107 fossero in grado di regolare l'espressione di Dicer (proteina) endogena. A tal scopo abbiamo misurato l'espressione di

Dicer per Western-blot in linee cellulari umane stabilmente trasdotte con MirVec: oltre alle U2OS, sono state trasdotte con “MirVec-103”, “MirVec-107”, “MirVec-shGFP” e “MirVec-154”, anche le linee MCF10A ed MDA-MB-231.

I risultati ottenuti dall’analisi mediante Western-blot per Dicer, in linee ad espressione stabile, sono riportati in Figura 11c. Si può chiaramente apprezzare come i livelli della proteina Dicer si riducano, rispetto ai controlli, nelle linee sovraesprimenti i miRNA della famiglia mir-103. Mi sono preoccupato che il risultato evidenziato non fosse dovuto ad un effetto “artefattuale”, per esempio legato alle sequenze fiancheggianti il maturo prima del taglio da parte di Drosha. Va infatti considerato che, fino ad ora, moltissimi studi di sovraespressione di microRNA sono stati condotti esclusivamente utilizzando frammenti genomici in cui la sequenza codificante il microRNA maturo è tipicamente fiancheggiata in 3’ e 5’ da segmenti di circa 200 paia di basi, ovviamente variabili da microRNA a microRNA. A nostro avviso questo disegno sperimentale rende difficile escludere la possibilità di “artefatti” dovuti ad effetti legati a queste sequenze fiancheggianti il maturo, piuttosto che non al maturo stesso. In effetti, dati non pubblicati nel nostro laboratorio hanno rivelato che, dopo un’indagine funzionale su larga scala di centinaia di microRNA umani, questo rischio è reale: l’attività biologica di alcuni microRNA non era dovuta alla sequenza del microRNA maturo, bensì alle regioni fiancheggianti (dati non mostrati).

Una prima risposta alla domanda è che sia miR-103 che miR-107 hanno lo stesso effetto su Dicer (Figura 11c); essi presentano sequenze del maturo identiche, se non per un solo nucleotide al 3’ (Tabella 2), ma regioni fiancheggianti completamente differenti. È quindi il miRNA maturo a mediare gli effetti dei pri-miR-103/107 stabilmente espressi dalle cellule U2OS, MCF10A e MDAMB231 (Figura 11c).

Secondo, l’analisi dei livelli della proteina Dicer è stata condotta anche in cellule trasfettate con la sola forma matura di miR-107. Le linee cellulari utilizzate per questa serie di esperimenti sono state le seguenti: HCT-116, HepG2, B9 ed MDA-MB-231. Come controlli negativi sono stati utilizzati un siRNA che non presenta bersagli nelle

cellule umane (“Control”) e una forma del maturo di miR-107 recante tre sostituzioni nucleotidiche nel suo seed (vedasi Introduzione) (“miR-107 MUT”). I risultati del western-blot per Dicer nelle cellule trasfettate con miR-107 maturo sono riportati in Figura 11d, in cui si apprezza per tutte le linee cellulari una riduzione dei livelli di Dicer rispetto ai controlli.

Da questa serie di esperimenti, condotti su molteplici linee cellulari, utilizzando controlli diversi e reagenti indipendenti, ho concluso che miR-103 e miR-107 sono in grado di regolare specificamente i livelli endogeni della proteina Dicer in molteplici contesti cellulari.

I miRNA della famiglia mir-103 inducono plasticità epiteliale in cellule HepG2

Ci siamo chiesti a questo punto quale potesse essere l’effetto fenotipico della sovraespressione in cellule umane dei miRNA della famiglia mir-103. Ho così trasfettato il miRNA maturo di miR-107 nella linea cellulare HepG2 (Materiali e Metodi). Come controllo negativo ho utilizzato una coltura di cellule HepG2 trasfettate con l’siRNA di controllo. Dopo 48 ore dall’inizio della trasfezione le cellule sono state tripsinizzate, diluite di 10 volte e ripiastrate. Non ho notato variazioni significative nei livelli di proliferazione ed apoptosi (dati non mostrati). Un cambiamento fenotipico nella forma e motilità delle cellule ha però attratto la mia attenzione. Tipicamente le cellule HepG2 hanno caratteristiche spiccatamente epiteliali, crescono compatte e adese le une alle altre, come si può osservare nelle cellule di controllo (“HepG2 Control”) in Figura 12a. Si può notare invece come le cellule trattate con miR-107 presentino lunghe protrusioni citoplasmatiche (filopodi) ed una ridotta adesività intercellulare (Figura 12b). Questo ci suggerisce una perdita di caratteristiche epiteliali nelle cellule trattate con miR-107, evidenziata anche dal Western-blot per E-Caderina, un noto componente delle giunzioni, largamente utilizzato come marcatore di “epitelialità”: i livelli di E-Caderina sono ridotti nelle cellule trattate con miR-107 rispetto ai controlli (Figura 12c).

Dato l'effetto di riduzione di adesività intercellulare e l'acquisizione di una morfologia a filopodi, tipiche caratteristiche di cellule mesenchimali, mi sono chiesti se gli effetti della riduzione di Dicer attraverso questi miRNA potessero influenzare la motilità cellulare.

MiRNA della famiglia mir-103 inducono un aumento della capacità migratoria ed invasiva di cellule metastatiche MDA-MB-231

Dopo il cambiamento morfologico osservato in cellule HepG2, abbiamo voluto saggiare gli effetti di miR107 sulla capacità migratoria di cellule altamente metastatiche ed invasive, quali le cellule di cancro mammario MDA-MB-231. A tal fine, ho utilizzato un semplice saggio in vitro, chiamato "Scratch assay": su un monostrato di cellule confluenti si crea un "graffio", uno "*scratch*", usando un puntale di pipetta Gilson. Le cellule dotate di capacità migratoria saranno in grado di richiudere il "graffio" entro un certo tempo. Facendo delle fotografie ad intervalli regolari sarà possibile misurare l'attività migratoria nei diversi campioni. Più nel dettaglio ho trasfettato delle cellule MDA-MB-231 con il maturo di miR-107 (Materiali e Metodi). Dopo due giorni dalla trasfezione, quando le cellule hanno raggiunto una confluenza del 100%, sono stati fatti tre "*scratches*" sul monostrato. Dopo altre 24 ore di incubazione si sono osservate le colture: nel caso della trasfezione di miR-107 gli "*scratches*" risultavano completamente richiusi (Figura 12f), mentre nei controlli restavano ancora aperti (Figura 12e).

Questi risultati permettono di ipotizzare un ruolo per i miRNA della famiglia mir-103, non solo nella plasticità epiteliale, ma anche nell'aumento della motilità cellulare in cellule umane.

Dicer è a valle dell'attività pro-invasiva di miR-103 e miR-107

I dati finora mostrati mettono in luce un'attività regolatoria da parte di miR-103 e miR-107 sull'espressione endogena di Dicer. Inoltre la sovraespressione di questi miRNA causa l'acquisizione di plasticità epiteliale e di un aumento di motilità cellulare. Ho quindi investigato la relazione causale tra i due fenomeni, ovvero che i cambiamenti

fenotipici riscontrati fossero causati dalla riduzione dei livelli di Dicer. A tal fine ho utilizzato un siRNA specifico per Dicer (“siDicer”), e ho valutato se l’inibizione di Dicer “fenocopiassse” l’effetto di miR-107, ovvero un aumento di attività migratoria in cellule di mammifero. L’siRNA per Dicer è stato trasfettato in cellule MDA-MB-231. In una prima serie di esperimenti, si è verificato che l’siRNA anti-Dicer, se utilizzato alla concentrazione di 100 pmoles/cm², causa una effettiva deplezione di proteina Dicer, come misurato in saggi di western blotting (Figura 12d). Da un punto di vista fenotipico, cellule quantitativamente deplete di Dicer apparivano sofferenti e non mostravano alcuna capacità migratoria, nè basale nè indotta da TGFβ (dati non mostrati). Ho quindi abbassato la quantità di Dicer siRNA di 10 volte, in modo da ottenere un knockdown parziale di Dicer, corrispondente ad una riduzione di Dicer endogena del 70%, simile a quella ottenuta con la sovraespressione di miR107 (Figura 12d). In queste condizioni, ho verificato che le cellule con parziale deplezione erano perfettamente vitali e dimostravano un aumento della motilità cellulare, simile a quanto osservabile con la sovraespressione di miR107 (Figure 12g e 12f, quantificato in 12h). Questo suggerisce che l’aumento della motilità cellulare ad opera di miR-107 sia imputabile alla riduzione dei livelli di Dicer.

I livelli di Dicer diminuiscono in linee di cellule mammarie tumorali di tipo staminale e/o altamente maligno

I risultati fino a qui descritti dimostrano come la riduzione dei livelli di Dicer nelle cellule umane correli con l’acquisizione di caratteristiche mesenchimali e con l’aumento di motilità cellulare. Mi sono chiesto se l’espressione di Dicer mostrasse variazione nei tumori umani in relazione al progredire della malattia. Ho quindi effettuato un’analisi preliminare utilizzando un database di espressione genica in linee cellulari di cancro della mammella (Neve et al., 2006). Per questa analisi ho confrontato i livelli di espressione di Dicer in linee cellulari rappresentative di tumori benigni o maligni, appartenenti rispettivamente alle due seguenti categorie:

- Cellule di tipo “luminale”, che presentano caratteristiche tipiche delle cellule epiteliali che delimitano il lume dei dotti della ghiandola mammaria (esprimenti tra gli altri marcatori E-Caderina ed il recettore per gli estrogeni, Figura 13a). Queste caratteristiche si riscontrano tipicamente in forme benigne di tumori della mammella (Sorlie et al., 2001).
- Cellule di tipo “mesenchimale” che non esprimono marcatori di differenziamento epiteliale, ma esprimono geni tipici di cellule mesenchimali, come ad esempio Vimentina (Figura 13a). Queste caratteristiche sono tipiche delle cellule tumorali metastatiche ed infatti molte delle linee cellulari appartenenti alla categoria “mesenchimale”, hanno mostrato abilità invasive della matrice extracellulare in esperimenti in vitro e sono capaci di formare metastasi una volta iniettate in topi immunodeficienti (Kenny et al., 2007; Neve et al., 2006).

L’espressione di Dicer risulta inferiore nelle linee “mesenchimali” rispetto a quelle “luminali” (Figura 13a), mostrando un andamento spesso concorde con quello dei marcatori di differenziamento.

L’espressione di Dicer è prognostica in pazienti con tumore mammario

Sulla base di questa evidenza mi sono chiesto, quindi, se l’espressione di Dicer nei tumori primari della mammella diminuisse con il progredire della malattia verso fenotipi meno differenziati e più metastatici. I dati per condurre questa analisi sono stati reperiti in database pubblici che raccolgono dati di espressione genica (ottenuti con l’utilizzo di microarray) per tumori espantati da gruppi di pazienti (trattati in diverse Istituzioni) affetti da tumore al seno e di cui è nota una storia clinica decennale. Il database fornisce oltre ai dati di espressione anche le relative caratteristiche istologiche, sulla base delle quali viene stabilito il “grado” di differenziamento del tumore tramite una scala nota come “Nottingham Grade” (Simpson et al., 2000). Questa scala divide i tumori in tre categorie: i tumori con caratteristiche ben differenziate sono definiti di “grado 1”, i

tumori scarsamente differenziati sono definiti di “grado 3” ed i tumori con caratteristiche di differenziamento intermedie sono definiti di “grado 2”. Analizzando l’espressione di Dicer ho rilevato che questa risultava consistentemente più bassa nei tumori di “grado 3” rispetto ai tumori di “grado 1” (Figura 13b).

Nel loro insieme questi dati ci hanno portato a pensare che Dicer possa essere un buon marcatore di differenziamento dei tumori della mammella. In questa ottica, un’elevata espressione di Dicer coinciderebbe con un fenotipo tumorale più differenziato, viceversa una bassa espressione coinciderebbe con caratteristiche istologiche di basso differenziamento, indice probabilmente di tumori altamente maligni. Mi sono quindi chiesto se fosse possibile utilizzare l’espressione di Dicer in un tumore primario della mammella, per definire la prognosi della malattia negli anni successivi all’espianto. In particolare, in collaborazione con il Prof. Silvio Biccato (Università di Modena e Reggio Emilia) abbiamo cercato di stabilire se i livelli di Dicer rilevati in tumori primari correlassero significativamente con la probabilità di sviluppo di metastasi negli stessi pazienti. Per fare questo abbiamo utilizzato i dati di espressione genica in tumori primari della mammella presenti nella banca dati del Netherlands Cancer Institute (NKI) (van de Vijver et al., 2002). Tra i dati clinici associati a questo database, c’è anche il decorso della malattia in termini di sviluppo di metastasi distali. Ci siamo focalizzati su questo database poiché estensivamente utilizzato per studiare il valore predittivo dell’espressione differenziale di geni (“signature” genetiche) nel prevedere il decorso del tumore alla mammella (Fan et al., 2006).

Per condurre questa analisi abbiamo per prima cosa diviso i tumori contenuti nel database in due gruppi, uno con alta espressione di Dicer (“high”), l’altro con bassa espressione di Dicer (“low”). A questo scopo abbiamo dovuto determinare un valore di soglia dell’espressione di Dicer: tumori che mostravano un livello di espressione superiore al valore soglia venivano caratterizzati come tumori appartenenti alla classe “high”, i restanti alla classe “low”. Per determinare il valore soglia abbiamo analizzato la distribuzione dei valori di espressione di Dicer nel campione (Figura 13c). Osservando il

grafico abbiamo verificato che la frequenza di distribuzione di Dicer presenta due picchi in corrispondenza dei valori logaritmici di espressione 0,07 e -0,02. Abbiamo pensato che questi due picchi fossero indicativi di due gruppi, appartenenti in realtà a popolazioni distinte. Abbiamo quindi definito il valore soglia in corrispondenza di quello che sembra essere, nella distribuzione, il punto di incontro delle due popolazioni (linea tratteggiata in Figura 11c).

Una volta derivati i due gruppi, “high” e “low”, ci siamo chiesti se questi gruppi differissero significativamente in termini di sviluppo di metastasi. Per questa analisi abbiamo utilizzato il metodo di Kaplan-Meier che definisce la probabilità nel tempo che un paziente non sviluppi metastasi (curve di sopravvivenza in assenza di metastasi). In un grafico Kaplan-Meier i gruppi “high” e “low” generano curve con andamento molto diverso (Figura 13d): il gruppo “high” disegna una curva con probabilità di sopravvivenza in assenza di metastasi nettamente più alte rispetto al gruppo “low”. La significatività statistica della differenza tra i due gruppi è stata valutata tramite Log-Rank Test, che ha fornito un P-Value di 0,002.

Sulla base di questi dati posso concludere che l’espressione di Dicer in tumori primari di mammella, può essere utilizzata come fattore prognostico per determinare se i pazienti svilupperanno o meno metastasi a partire da un profilo di espressione nella massa tumorale primaria. In altre parole, si potrebbe standardizzare un test, sulla base del quale l’espressione di Dicer definisce un fattore di rischio per lo sviluppo di metastasi.

Questa conclusione è consistente con l’osservazione precedentemente pubblicata da Karube (Karube et al., 2005), per cui livelli bassi di Dicer correlano con una minore sopravvivenza di pazienti affetti da “Non-Small Cells Lung Cancer”.

DISCUSSIONE PARTE B

Dicer e microRNA

Questo lavoro presenta la prima evidenza in favore del ruolo di microRNA nella regolazione post-trascrizionale di Dicer.

Questa nozione è supportata da vari risultati sperimentali:

- 1) Nonostante Dicer sia un gene housekeeping, il suo 3'UTR è molto lungo, caratteristica tipica di geni sotto controllo post-trascrizionale da parte di piccoli RNA.
- 2) Nel 3'UTR di Dicer abbiamo individuato ben 8 ridondanti siti di legame per i microRNA della famiglia mir-103. Questi microRNA sono prodotti da regioni genomiche distinte, a partire dallo splicing del penultimo introne dei geni PANK1, PANK2 e PANK3. Mentre i miR103/107 maturi hanno sequenza quasi identica (si distinguono per un singolo nucleotide, peraltro esterno al seed, tabella 2), la loro sequenza genomica fiancheggiante diverge profondamente (allo stadio di pri-miRNA).
- 3) Overespressione di miR103 o di miR107, siano essi sotto forma di microRNA maturi o di pri-miRNA, causa un'inibizione dell'espressione di Dicer. Questo è verificabile sia utilizzando dei sensori per l'attività di Dicer (3'UTR di Dicer fuso alla luciferasi, Figura 11b), sia sui livelli di Dicer endogeno (Figure 11c e 11d).

Il fatto che Dicer sia inibito dai suoi prodotti corrisponde ad un classico meccanismo di feedback negativo. Detto ciò, è legittimo chiedersi con quale meccanismo miR-103/107 riesca a dominare sull'espressione del suo "creatore", Dicer, anche quando i livelli di quest'ultimo diminuiscono. Un aspetto che crediamo importante a questo proposito è la multimerizzazione dei siti per miR-103/107 nel 3'UTR di Dicer: è facile ipotizzare che le otto ripetizioni di siti di legame di questo specifico gene lo rendano particolarmente sensibile a miR-103/107 anche quando i livelli di miR-103/107 sono bassissimi e non-

effettivi su altri bersagli. E' da notare che gli effetti quantitativi sull'espressione genica mediati da microRNA sono in gran parte sconosciuti.

Possiamo anche supporre che un'analisi matematica della dinamica del sistema Dicer/miR103-107 possa fornire in futuro validi spunti per un'ulteriore analisi sperimentale. Intuitivamente, è plausibile che il "sistema" raggiunga ad un certo punto un plateau "minimo" che garantisca che i livelli di Dicer non possano scendere oltre una certa soglia minima. Questo garantirebbe alla cellula i livelli sufficienti di Dicer richiesti per la sua sopravvivenza. E' chiaro infatti che il knockout di Dicer è letale a livello embrionale ed impedisce in oociti la maturazione a gameti funzionali; al contrario, inattivazioni meno quantitative, quali quelle che possiamo ipotizzare nel knockout zigotico in zebrafish, sono compatibili con la vitalità cellulare (tanto che gli embrioni dicer knockout in questo animale modello si sviluppano in modo relativamente normale fino a stadi avanzati, pur morendo a causa di un sistema nervoso difettoso).

A supporto di un ruolo essenziale per Dicer, abbiamo verificato in questo studio che una sua deplezione quantitativa rende le cellule di mammifero particolarmente fragili e difficili da amplificare. Studi ulteriori sono necessari per comprendere le cause di questo fenotipo (apoptosi, arresto proliferativo, instabilità genomica, incapacità di sfruttare segnali trofici, difettivo attaccamento al substrato e altri).

MiR103/107 promuove la motilità cellulare in vitro attraverso l'inibizione di Dicer

Questo lavoro presenta due aspetti di novità particolarmente interessanti:

- A) l'individuazione di una nuova famiglia di microRNA, miR103/107, capace di promuovere la plasticità epiteliale e la motilità cellulare.
- B) la definizione, per la prima volta, di Dicer come regolatore della motilità cellulare.

Le evidenze che supportano queste conclusioni sono le seguenti:

- la sovraespressione transiente di miR107 induce in cellule HepG2 un aumento drammatico nel numero di protrusioni citoplasmatiche classificabili come filopodi e

lamellipoidi. Questa risposta è specifica, in quanto esperimenti di controllo realizzati mediante trasfezione di siRNA (Figura 12a) - oppure di microRNA 107 con mutazioni puntiformi nel seed (dati non mostrati) - sono privi di effetto. E' importante notare come le variazioni fenotipiche correlino in cellule HepG2 con la drastica diminuzione di un marcatore di "epitelialita", quale E-caderina(Figura 12c).

- la sovraespressione di miR-107 in cellule MDA-MB-231 causa un chiaro aumento nelle capacità migratorie di queste cellule. Come discusso sotto, queste cellule appartengono alla categoria di cellule tumorali mammarie di tipo "mesenchimale" (Figura 13a) e costituiscono un modello molto utilizzato nello studio dell'invasività e disseminazione metastatica. Un dato importante in questo contesto è che la parziale inattivazione di Dicer, mediante trasfezioni di Dicer siRNA a concentrazioni subottimali, fenocopia l'effetto di miR107 (Figure 12f e 12g).

In futuro mi propongo di rafforzare l'"asse" che lega miR-107 a Dicer mediante esperimenti di epistasi. Sebbene i dati qui presentati siano suggestivi di una forte connessione, è ben noto che i microRNA hanno effetti pleiotropici, potenzialmente mediati dall'effetto su molteplici bersagli. Per risolvere questa questione di specificità di bersaglio, sono ora in corso vari esperimenti tra cui:

a) saggiare l'effetto di miR-107 in cellule che mancano di Dicer (dopo sua deplezione più quantitativa). Se miR-107 agisse mediante un target diverso da Dicer nel promuovere la migrazione, l'effetto di miR-107 dovrebbe permanere. Se invece Dicer è il principale mediatore degli effetti di miR-107, la perdita di Dicer dovrebbe essere epistatica.

b) in una doppia deplezione di Dicer e miR-107 endogeni (quest'ultima ottenibile mediante l'uso di oligonucleotidi antagomiR (Dharmacon)) ci aspettiamo che il fenotipo dominante resti quello di Dicer.

c) verificare che la sovraespressione di Dicer recuperi il fenotipo di miR-107.

Quali sono i precedenti per l'effetto biologico di miR-107 qui riportato? E' stato recentemente pubblicato che la sovraespressione di membri della famiglia mir-200 (miR-200 e 205) ha effetti opposti a quelli qui descritti. I miR-200 infatti inibiscono la transizione da epitelio a mesenchima in cellule tumorali, stabilizzando l'espressione di E-Caderina. Biochimicamente, i miR-200 agiscono sul 3'UTR di fattori di trascrizione (SIP1, ZEB1) che normalmente inibiscono l'espressione di E-Caderina e attivano quella di geni mesenchimali, quali Vimentina e Actina del muscolo liscio.

La possibilità di una connessione tra miR-103/107 e miR-200 rimane da definirsi.

E' ipotizzabile che i ridotti livelli di Dicer che seguono l'attività di miR-103/107 causino, indirettamente, una repressione dei livelli di miR-200. Secondo questa ipotesi, l'aumento della motilità causata da miR-107 sarebbe uno tra i prodotti "secondari" che seguono una parziale inattivazione di Dicer. A conferma di questa idea, abbiamo verificato che livelli di Vimentina, ZEB1 e SIP1 sono aumentati in cellule esperimenti miR-107 nonché un aumento di motilità cellulare comparabile a quello mediato da miR-107 dopo parziale riduzione di Dicer (ovvero a livelli intermedi tra quelli di cellule MDA-MB-231 wild-type, e quelli ottenuti dopo deplezione più quantitativa con alte dosi di siRNA). E' interessante notare che, in letteratura, l'aumento di Vimentina (noto marcatore di transizione epitelio-mesenchima) è già stato osservato in cellule in cui Dicer è stato inattivato parzialmente mediante knock-in genico (Ting et al., 2008).

Ancora una volta, la rilevanza biologica di variazioni quantitative nei livelli di "master genes" quali Dicer rimane largamente inesplorata. Un'indagine mirata e diretta sui livelli di Dicer in tumori umani non è ancora stata realizzata; è intrigante notare che dati disponibili in letteratura su microarrays di microRNA dimostrano che i livelli generali di microRNA si riducano in vari tipi tumorali, evento compatibile con una riduzione dei livelli di Dicer durante la tumorigenesi (Lu et al., 2005).

I dati presentati suggeriscono l'esistenza di una "finestra di concentrazione" di Dicer che garantisce la sopravvivenza ma permette la migrazione; tale condizione può venire

sfruttata da cellule tumorali a proprio vantaggio, per favorire processi invasivi e metastatici.

Ridotta espressione di Dicer come fattore prognostico di malignità in cellule tumorali di mammella

I dati presentati in Figura 13a suggeriscono che i livelli di RNA per Dicer correlano con l'acquisizione di caratteristiche mesenchimali e maligne. Abbiamo infatti verificato in dati di microarrays generati da altri (Neve et al., 2006) che in una batteria di linee cellulari di mammella i livelli di Dicer sono drammaticamente diversi tra cellule di tipo "luminale" (alto Dicer) e cellule di tipo "mesenchimale" (basso Dicer). E' interessante notare come i geni marcatori precedentemente descritti come responsivi a miR-103, ovvero Vimentina e E-caderina, definiscano le stesse popolazioni cellulari (Figura 13a).

Nella categoria di cellule mesenchimali rientrano le cellule tumorali impiegate in questo studio: le MDA-MB-231. Mi sono chiesto come fosse possibile che miR-107 riesca a sortire effetti in cellule che hanno già bassi livelli di Dicer. In parte, questo può essere spiegato dall'efficacia di miR-107 su siti di riconoscimento multipli presenti in Dicer 3'UTR (vedi sopra). Un'altra spiegazione si relaziona al fatto che le MDA-MB-231 esprimono sì livelli di Dicer endogeno inferiori rispetto alle linee luminali, senza però raggiungere livelli di espressione al limite minimo di rilevabilità di altre linee metastatiche (ad esempio le HS578T o le MDA-MB-436). In altre parole, il sistema Dicer/miR-107 appare ancora modulabile in MDA-MB-231.

Mi sono poi chiesto se alle differenze d'espressione di Dicer osservate su linee cellulari di diverso grado differenziativo corrispondessero variazioni simili nei tumori primari espantati da pazienti. In Figura 13b, mostro che i bassi livelli di Dicer correlano con un basso grado differenziativo a livello istologico ("grado 3", nella scala internazionale di Nottingham). Questo risultato ha suggerito la possibilità che i bassi livelli di Dicer verificati sulle masse primarie espantate da pazienti fossero prognostici per stratificare i pazienti in funzione del rischio di sviluppare metastasi. Per indagare

questa ipotesi, abbiamo utilizzato una grande coorte di pazienti dell'NKI, di cui sono disponibili dati di espressione (per microarrays) e dati clinici. Straordinariamente, si è verificato che “basso Dicer” è prognostico di una elevata probabilità di sviluppo di metastasi negli anni successivi all'espanto. La robustezza statistica di questa predizione ($P=0.002$) è comparabile a quella ottenibile con altri classificatori più complessi (si veda Fan et al., 2006) applicati allo stesso dataset.

Elementi di criticità e direzioni future

Un aspetto mancante dalla presente analisi, riguarda l'effettivo ruolo endogeno di miR-103/107 per la motilità cellulare e per la metastasi. Una delle priorità di ricerca nel prossimo futuro è ora quella di definire il pattern di espressione dei membri della famiglia mir-103 in linee cellulari diverse ed in tumori primari. In particolare, ci interessa correlare i livelli di miR-103/107 con quelli di Dicer in varie linee cellulari. Per esempio, ci si aspetta che miR-103/107 sia altamente espresso nelle linee che hanno basso Dicer e viceversa. Definire il pattern di espressione di miR-103/107 in linee cellulari sarà anche cruciale per chiarire quali modelli cellulari utilizzare in saggi di metastasi. Infatti i dati finora presentati sono stati ottenuti mediante sovraespressione di miR-103/107. Come strategia di *loss-of-function*, utilizzeremo un inibitore specifico dei miRNA, chiamato antagomiR che è stato dimostrato essere in grado di ridurre i livelli dei miRNA endogeni (Kruzfeldt et al., 2005). Una volta identificata una linea cellulare metastatica in cui miR-103/107 sia espresso ad alti livelli, verificheremo se la sua inattivazione via trasfezione di antagomiR porti ad una ridotta attività migratoria e/o invasiva in queste cellule. Al contrario, utilizzeremo cellule con livelli minimi di miR-103/107 per saggi di *gain-of-function*, in cui verificheremo un'eventuale acquisizione di caratteristiche metastatiche.

Il fatto che i livelli del trascritto di Dicer siano prognostici per lo sviluppo di metastasi in pazienti con tumore della mammella permette di ipotizzare l'utilizzo di anticorpi anti-

Dicer altamente specifici per la rilevazione dei livelli di proteina in masse tumorali espianate (ad esempio con sistemi ELISA o di rilevazione immunocitochimica); in linea di principio questo permetterebbe un futuro utilizzo di Dicer a fini prognostici in ambito clinico.

Nelle analisi di dati fino a qui condotte sono stati correlati i livelli di Dicer in tumori primari di mammella con il rischio di metastasi. Nella prima parte di questo studio ho però dimostrato come Dicer sia regolato da miRNA della famiglia mir-103. I dati ad oggi disponibili in database di espressione di miRNA relativi a pazienti oncologici sono scarsi e poco consistenti. Questo non ha permesso di analizzare la correlazione tra livelli di miR-103/107 e la probabilità di sviluppo di metastasi in pazienti con tumore al seno.

Un dato interessante emerso in letteratura ha riguardato uno studio sui livelli di miRNA, mediante Real-time qPCR, in carcinoma squamoso esofageo da cui emerge che elevati livelli di miR-103/107 correlano con una scarsa sopravvivenza (Guo et al., 2008). Mi propongo pertanto di eseguire studi analoghi nel caso di tumore al seno, al fine di verificare un legame diretto tra metastasi e i livelli di questi miRNA.

Come già accennato in precedenza, le sequenze genomiche di miR-103 e miR-107 mappano nel penultimo introne rispettivamente di PANK1, PANK2 e PANK3; la rilevazione dei livelli di questi trascritti può essere indicativa così dei livelli di questi miRNA. E' interessante notare che nelle linee di tumore della mammella "mesenchimali" (Figura 13a), caratterizzate da un elevato potenziale invasivo/metastatico e da bassi livelli di Dicer, sono stati riscontrati livelli elevati di PANK2.

Infine, un'aspetto particolarmente intrigante è la correlazione degli effetti di miR-103/107 con quelli dei loro geni ospiti, ovvero la famiglia PANK. Questi geni codificano per l'enzima pantotenato chinasi, un enzima coinvolto nella sintesi di coenzima-A (CoA). In *Drosophila*, il mutante per il gene omologo ai geni PANK umani (mutante *fumble*) presenta difetti legati alla divisione cellulare in diversi tessuti durante lo sviluppo embrionale. I mutanti in *fumble* associano PANK alla biogenesi dei lipidi (Afshar et al., 2001). Troviamo altamente suggestivo che un microRNA che regola la

plasticità epiteliale e che promuove la formazione di lamellipodi ed altre modifiche della superficie cellulare sia contenuto in geni codificanti per enzimi coinvolti nella biogenesi delle membrane. Studi futuri saranno richiesti per studiare il ruolo di PANK1-3 nella migrazione cellulare e delle relazioni funzionali tra i PANK e miR103/107.

MATERIALI E METODI

RT-PCR per miRNA maturi

Per rilevare microRNA maturi o piccolo RNA, ho seguito il protocollo descritto in Shi et al., 2005, con alcune modifiche. In breve, l'RNA totale è stato purificato con Trizol seguendo le indicazioni del produttore; 5 µg di RNA totale sono state poliadenilate in vitro con l'enzima PAP polimerasi di E.coli (Ambion). La sintesi del primo filamento di cDNA è avvenuto usando un adattatore polyT. I prodotti di PCR corrispondenti ai microRNA maturi sono stati amplificati usando un primer Reverse universale e un primer Forward specifico per ogni miRNA (Tabella 3).

Primer Name	Sequence
xenopus miR-15a	5'-TAGCAGCACATAATGGTTTGTG-3'
xenopus miR-15b	5'-TAGCAGCACATCATGATTTGCA-3'
xenopus miR-15c	5'-TAGCAGCACATCATGGTTTGTGTA-3'
xenopus miR-16a	5'-TAGCAGCACGTAATAATTGGTG-3'
xenopus miR-16b	5'-TAGCAGCACGTAATAATTGGGT-3'
xenopus miR-16c	5'-TAGCAGCACGTAATAACTGGAG-3'
xenopus miR-210	5'-CTGTGCGTGTGACAGCGGCTGA-3'
xenopus miR-214	5'-ACAGCAGGCACAGACAGGCAGT-3'
xenopus snRNA U2	5'-CTCCAGGACCGGTGCACTT-3'
Reverse primer	5'-GCGAGCACAGAATTAATACGACTCAC-3'

Tabella 3: primer per RT-PCR di miRNA.

Plasmidi, microRNA e antimiR

I miRNA endogeni sono stati purificati come descritto in precedenza¹⁰. Per la generazione dei reporter ACVR2a-wt e -mut, la regione codificante la luciferasi è stata inserita nel plasmide pcDNA3.1; il primo sito di legame per miR-15/16 presente nella 3'UTR di ACVR2a è stato clonato a valle della luciferasi, inserendo un oligonucleotide a doppio

filamento di DNA. Pri-miR-15/16a e pri-miR-127, usato come controllo, sono stati amplificati da DNA genomico mediante PCR e successivamente clonati in pCS2 e sequenziati. Il corrispondente RNA è stato trascritto in vitro usando Message Machine (Ambion). E' stata osservata una migliore attività biologica nel caso di RNA contenenti cap e coda di polyA. Le sequenze di miR-15 maturo sono:

wt-sense 5'UAG CAG CAC AUA AUG GUU UGU GUU3'; wt-antisense 5'CAC AAA CCA UUA UGU GCU GGA UUU3'; mut-sense 5'UUC GUC AAC AUA AUG GUU UGU GUU3'; mut-antisense 5'CAC AAA CCA UUA UGU UGA CCU UUU3' (Invitrogen). Le sequenze degli AntimiR (Ambion) sono: antimiR-15 5'-AAU CCA CAA ACC AUU AUG UGC UGC UAC UUU-3'; antimiR-16 5'-AAU CCU CCA GUA UUU ACG UGC UGC UAA GGC -3'.

Saggi biologici e biochimici

La sintesi in vitro di mRNA, la manipolazione e la microiniezione di embrioni di *Xenopus* sono state eseguite come descritto precedentemente (Piccolo et al., 1999). I miRNA maturi e gli antimiR sono stati risospesi in 0.5 mM HEPES, pH 7.6. Per i saggi di luciferasi gli embrioni sono stati iniettati radialmente con 40 pg di plasmide reporter insieme a 150 pg di mRNA di lacZ, e raccolti a gastrula. I valori di luciferasi sono stati normalizzati all'attività di β -gal. Per ogni esperimento il valore di luciferasi è la media di almeno tre set indipendenti di 5 embrioni ciascuno. In fig. 4h, j, ho misurato l'effetto di Wnt/ β -catenina sull'attività di miR-15/16, considerando l'inibizione percentuale (tipicamente il 50% come in fig 1 c) tra ACVR2a-mut e wild-type. Le cellule HepG2 sono state trasfettate con Lipo2000 (Invitrogen) in DMEM, siero al 10%, con il plasmide reporter CAGA12 (40 ng/cm²) e miR o antimiR (300 ng/cm²); pCS2-lacZ (20 ng/cm²) è stato utilizzato come normalizzante. In ogni esperimento ogni campione è stato trasfettato almeno in duplicato. Le cellule sono state trattate con la proteina ActivinA, in un mezzo contenente lo 0.1% di siero.

Western blotting

Le cellule, o gli embrioni, vengono lisate con un buffer di lisi (HEPES pH7.8 50mM, NaCl 200mM, EDTA 5mM, NP-40 1%, glicerolo 5%, DTT 1mM), vengono vortexate e centrifugate 10 minuti a 4°C. Gli estratti così ottenuti vengono bolliti in 1X FSB (50mM Tris pH=6,8, 2% SDS, 0,1% Bromofenolo Blu, 10% glicerolo), vengono corsi in un gel di acrilamide/bis-acrilamide 30:1 di concentrazione variabile con buffer Tris-Glicina (30g Tris, 144g Glicina, 5g SDS /litro). Le proteine così separate sono trasferite elettroforeticamente su di una membrana di PVDF (Millipore) in una soluzione di trasferimento (Tris 50mM, glicina 40mM, metanolo 20%, SDS 0.04%). Dopo una incubazione di un'ora a RT in TBST (8g NaCl, 2,4g Tris, 0,1% Tween20/litro, pH=7,5) +1% latte in polvere, la membrana viene incubata o.n. a 4°C con l'anticorpo primario diluito in TBST +1% latte. Dopo tre lavaggi da 10 minuti con TBST a RT, la membrana viene incubata 45 minuti con l'anticorpo secondario coniugato a perossidasi, diluito in TBST +1% latte. Dopo tre lavaggi da 10 minuti con TBST a RT, le bande vengono visualizzate incubando la membrana con 50 ml/cm² di substrato contenente luminolo (Pierce) ed esponendo delle lastre radiografiche. L'anticorpo policlonale anti-ACVR2a è stato acquistato da R&D.

Ibridazione In situ ed immunostochimica

L'ibridazione *in situ* è stata eseguita come descritto in precedenza (Piccolo et al., 1999). Per l'immunostochimica gli embrioni sono stati fissati 2 ore a RT in MEMFA e poi in 80%metanolo/20% DMSO a -20°C. Sono stati lavati in PBS, disidratati, inclusi in paraffina e tagliati in sezioni di 20 um. E' stata poi rimossa la paraffina dalle sezioni, sono state reidratate e trattate per 45 minuti con H₂O₂ per bloccare le perossidasi endogene. Le sezioni sono poi state bloccate per 30 minuti in PBS, 0,1% Tween-20, 10% goat serum e successivamente incubate o.n. a 4°C con un anticorpo anti-ACVR2a nel medesimo buffer. Il segnale è stato rilevato con un kit Vectastain ABC-Elite (Vector Lab),

i campioni sono stati osservati con uno microscopio Zeiss Axioplan equipaggiato con una telecamera Leica DC500.

Generazione di retrovirus ricombinanti e trasduzione delle cellule U2OS

Per ottenere le particelle retrovirali contenenti il vettore di interesse abbiamo utilizzato le cellule di packaging 293 GP. Queste cellule esprimono costitutivamente i prodotti delle sequenze retrovirali Gag e Pol; Env, ultimo componente richiesto alla corretta formazione di particelle virali complete, viene invece fornito transientemente.

I vettori “MirVec-103” e “MirVec-107” sono stati trasfettati, insieme ad un plasmide per l’espressione di Env, nelle cellule di packaging con il metodo del calcio-fosfato.

A 24 ore dalla trasfezione, il mezzo di coltura delle cellule di packaging, contenente a questo punto le particelle virali ricombinanti, è stato raccolto e filtrato (filtro da 0,45 µm).

Le cellule U2OS da trasdurre, sono state piastrate ad una confluenza del 10% e sono state lasciate 24 ore a contatto con le particelle virali diluite 1:2 in terreno di coltura completo.

Le cellule sono poi state mantenute in coltura in presenza di Blasticidina, un antibiotico utilizzato per la selezione delle sole cellule infettate.

Infatti il vettore MirVec contiene un gene per la resistenza alla Blasticidina, perciò soltanto le cellule infettate saranno in grado di crescere in presenza di questo antibiotico.

Per controllare che l’antibiotico fosse funzionante si sono coltivate, in presenza di questo, delle cellule non trasdotte; queste sono morte dopo 48 ore e ciò è indice del corretto funzionamento dell’agente di selezione. La selezione delle cellule trasdotte è continuata per una settimana, un periodo di tempo sufficiente a ritenere che in coltura fossero rimaste soltanto cellule correttamente infettate.

La stessa procedura è stata seguita per la trasduzione di U2OS con i costrutti di controllo “MirVec-shGFP” e “MirVec-154”.

Trasfezione di “Dicer 3’UTR Lux” mediante utilizzo di liposomi

Le linee cellulari “U2OS miR-103”, “U2OS miR-107”, “U2OS miR-154” e “U2OS shGFP” sono state trasfettate transientemente con il sensore “Dicer 3’UTR Lux” ed in parallelo con il costrutto di controllo “Control Lux”. Le cellule sono state piastrate ad una confluenza iniziale del 20% in terreno di coltura completo.

Dopo 24 ore è stato trasfettato il sensore “Dicer 3’UTR Lux” o alternativamente “Control Lux”, attraverso il reagente di trasfezione “TransIT-LT1” (Mirus).

Abbiamo aspettato 24 ore, periodo di tempo sufficiente al completamento della trasfezione ed a garantire l’espressione della luciferasi.

A questo punto abbiamo rimosso il terreno di coltura, lavato le cellule con HBSS e raccolto le cellule stesse in un buffer di lisi specifico per la lettura della luciferasi.

Saggio di luciferasi in cellule U2OS overesprimenti miR-103 o miR-107

Dopo la trasfezione del sensore “Dicer 3’UTR Lux” o del costrutto di controllo “Control Lux” (come indicato nella sezione “Protocolli di Base”), le cellule vengono raccolte con 200 ml buffer di lisi (1% NP40, 10% glicerolo, 2,5 mM EDTA, 25 mM Tris, pH=7,5), e si procede alla quantificazione della luciferasi tramite lettura al luminometro, mescolando 30 μ l di lisato cellulare con 60 μ l di una soluzione contenente luciferina (20 mM Tricina, 1 mM $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2,7 mM MgSO_4 , 0,1 mM EDTA, 33 mM DTT, 270 mM CoenzimaA, 470 mM luciferina, 530mM ATP, pH=7,8). I valori di espressione del reporter (luciferasi) vengono normalizzati mediante co-trasfezione di un plasmide esprime in maniera costitutiva l’enzima β -galattosidasi. La produzione della β -galattosidasi viene monitorata allestendo in piastre da 96 pozzetti una reazione con 10 μ l di estratto e 160 μ l di una soluzione (0,1M buffer fosfato pH=8, 10mM KCl, 1mM MgSO_4) contenente il substrato solubile CPRG 5mM; l’enzima β -galattosidasi converte il substrato, normalmente giallo, in una sostanza rossa, la cui concentrazione viene determinata allo spettrofotometro. Ogni campione viene trasfettato in doppio, ed ogni esperimento è stato ripetuto almeno tre volte.

Nel caso specifico si trasfettano 100 ng di DNA “Dicer 3’UTR Lux” o “Control Lux” reso RF per purificazione fenolo:cloroformio e precipitazione NaAc/Etanolio insieme a 200 ng di DNA per β -galattosidasi, per la normalizzazione. La lisi viene effettuata mediante l’utilizzo di una soluzione specifica per il saggio di luciferasi. Dopo la lisi, gli estratti vengono chiarificati centrifugando 10 min alla massima velocità a 4°C, e si prosegue con la lettura della luciferasi e della β -galattosidasi, come descritto sopra.

Trasfezione di miR-107 e miR-103 maturi in linee cellulari

La trasfezione dei maturi è stata eseguita con il reagente di trasfezione “RNA-I Max Lipofectamin” (Invitrogen) secondo le stesse modalità descritte precedentemente per la trasfezione di DNA mediante liposomi. Le cellule sono state raccolte 36 ore dopo la trasfezione e processate per il western blot.

Produzione particelle retrovirali per trasduzione stabile

Per ottenere le particelle retrovirali contenenti il vettore d’interesse abbiamo utilizzato le cellule di packaging 293 GP. Queste cellule esprimono costitutivamente i prodotti delle sequenze retrovirali Gag e Pol; un plasmide di espressione per Env, ultimo componente richiesto alla corretta formazione di particelle virali complete, viene invece fornito mediante trasfezione transiente.

I vettori “MirVec” (Voorhoeve et al., 2006) sono stati trasfettati, insieme al plasmide contenente Env, nelle cellule di packaging mediante metodo del calcio-fosfato.

A 24 ore dalla trasfezione, il mezzo di coltura delle cellule di packaging, contenente a questo punto le particelle virali ricombinanti, è stato raccolto e filtrato. Le cellule da trasdurre sono state lasciate 24 ore a contatto con le particelle virali. Le cellule sono poi state mantenute in coltura in presenza di Blastidina, un antibiotico utilizzato per la selezione delle sole cellule infettate, per una settimana. Abbiamo verificato che le cellule

non trasdotte erano morte dopo sole 48 ore di coltura in presenza di questo agente di selezione, mentre le cellule trasdotte non ne subivano gli effetti.

Realtime PCR su miRNA mediante sonde taqman

Le ridotte dimensioni del microRNA maturo (21-25 nucleotidi) non permettono il legame contemporaneo dei due primers da PCR, per questa ragione abbiamo utilizzato la tecnologia TaqMan (“TaqMan microRNA Assays”, Applied Biosystems). In seguito all’ estrazione dell’RNA totale dalle cellule in analisi, si procede con la retrotrascrizione del solo miRNA di interesse utilizzando un primer specifico “Looped RT Primer”). Questo primer presenta una porzione libera al 3’ complementare al miRNA maturo d’interesse, che permette la sintesi del cDNA in maniera specifica. Per il resto della sua lunghezza il “Looped RT Primer” forma una struttura a forcina: questa limita le interazioni aspecifiche del primer con altre molecole di RNA durante la retrotrascrizione. Si noti che il ruolo chiave del primer è quello di generare un cDNA di dimensioni maggiori rispetto a quelle del solo miRNA maturo.

Il cDNA che si ottiene sarà infatti alla fine composto dalla sequenza del miRNA maturo e dalla sequenza che nel primer formava la struttura a forcina, raggiungendo dimensioni complessive di circa 90 nucleotidi e rendendone così possibile l’amplificazione mediante PCR.

Per l’amplificazione è stato utilizzato un primer *forward* complementare alla sequenza del miRNA di interesse, ed un primer *reverse* complementare al “Looped RT Primer” .

Come controllo di caricamento è stato utilizzato snRNA U6 (un piccolo RNA nucleare che fa parte del complesso di regolazione dello splicing e i cui livelli si assumono costanti nelle cellule).

Protocolli di Base:

Purificazione del DNA da soluzioni contenenti proteine

Si porta la soluzione di DNA ad un volume minimo di 100 µl con acqua. Si aggiunge quindi 1 volume di una soluzione contenente fenolo (precedentemente equilibrato con Tris-HCl pH 8) e cloroformio in proporzione 1:1, si mescola e si centrifuga per 2 min a 16000 rcf per separare la fase acquosa da quella organica. Si preleva quindi la fase acquosa, la si aggiunge ad 1 volume di cloroformio, si mescola e si centrifuga per 1 min a 16000 rcf per separare nuovamente la fase acquosa da quella organica. Alla fine la fase acquosa contiene gli acidi nucleici ed è stata purificata da proteine ed da eventuali residui di fenolo. In seguito si procede con una precipitazione per concentrare il DNA.

Precipitazione del DNA

Si aggiungono al DNA in soluzione acquosa 2,5 volumi di 100% etanolo e 0,1 volumi di 3M sodio acetato pH 5,2. Dopo aver mescolato abbondantemente, la soluzione viene raffreddata (10 min a -80°C, o qualche secondo in azoto liquido) e poi centrifugata 30 min a 16000 rcf a 4°C. Eliminato il surnatante si lava il pellet incubando 5 min a RT in 500 µl di 70% etanolo. Eliminato l'etanolo di lavaggio, si asciuga il pellet di acidi nucleici a 37°C o in una centrifuga speedvac. Infine si sospende il DNA in un volume opportuno di acqua o TE a seconda delle applicazioni successive. Un punto critico della precipitazione è la forza ionica. E' possibile usare sali diversi per raggiungere scopi diversi: se ad esempio al posto del sodio acetato si usa l'ammonio acetato (a concentrazione finale 0,5 M) precipiteranno gli acidi nucleici ma verranno lasciati in sospensione i nucleotidi. Se i pellet di acido nucleico sono troppo piccoli, è possibile renderli più visibili, aggiungendo 5 µg di tRNA di lievito assieme al 100% etanolo e al sodio acetato.

Estrazione dell'RNA cellulare

Si aggiunge alle cellule di coltura disciolte in trizolo (Invitrogen), cloroformio RF pari a 1/5 di volume del campione. Quindi si mescola e si centrifuga 10 min a 4°C per separare le fasi. Si recupera la fase acquosa facendo attenzione a non prelevare materiale all'interfaccia. Si aggiunge il surnatante a un ugual volume di cloroformio, si mescola e si riseparano le fasi come sopra; si trasferisce il surnatante in isopropanolo. Si precipita l'RNA raffreddando per 15 min a -80°C e centrifugando 16000 rcf per 30 min a 4°C. Si lava il pellet con 500 µl 70% di etanolo, si secca in speedvac e si risospende in 20 µl d'acqua RF. Si mette ad incubare il campione per 5 min a 70°C e poi in ghiaccio per 1 min al fine di distendere eventuali forcine e loop, in vista della retrotrascrizione.

Sintesi del primo filamento di cDNA

La reazione di sintesi del primo filamento di cDNA viene allestita per un volume finale di 20µl come segue:

RNA purificato	2 µl
Acqua	4,4 µl
5' RT buffer	4 µl
5 mM dNTPs	2 µl
100 µM d(N) ₆ random primer	2 µl
0,1 M DTT	2 µl
0,1% BSA	2 µl
inibitore di RNAasi	0,6 µl
MMLV-RT	1 µl

I campioni vengono incubati per 45 min a 50°C.

PCR: Reazione a catena della polimerasi

Nei tubi di reazione si aliquota 1µl di cDNA o di DNA genomico per ogni campione. Si sono utilizzate le seguenti condizioni di amplificazione:

Denaturazione	94°C per 20 sec
Annealing	T _m - 10°C per 20 sec

Allungamento 72°C per 45 sec

Per ciascun campione si allestisce la seguente reazione:

acqua	13,5 µl
10' PCR buffer	2 µl
10 µM Oligo mix	1 µl
2 mM dNTPs	0,5 µl
Taq polimerasi	1 µl

I tubi si posizionano nel termociclatore (con coperchio riscaldato) precedentemente portato a 94°C.

Digestione con enzimi di restrizione

La quantità di enzima necessaria per una reazione di digestione viene calcolata in base alla quantità di DNA che deve essere digerita (si considera che 1 unità di enzima è in grado di digerire 1 µg di DNA in 1 ora a 37°C). Si prepara quindi la reazione nel modo seguente:

Alle volte è necessario aggiungere BSA ad una concentrazione finale dello 0,01% in funzione di alcuni enzimi specifici. Dopo l'aggiunta di tutti i reagenti, la miscela viene mescolata agitando manualmente, raccolta sul fondo dell'eppendorf con una breve centrifugata, e messa ad incubare alla temperatura ottimale per l'enzima (generalmente 37°C) per un minimo di un'ora. Il tempo di incubazione può essere aumentato fino a sedici ore (reazione overnight). Terminata la reazione, 1/10 di volume della miscela viene controllato in gel di agarosio alla concentrazione più adatta.

Defosforilazione delle estremità 5' di molecole di DNA

Una fosfatasi alcalina batterica, l'enzima BAP, permette di defosforilare le estremità 5' del DNA. Essa viene normalmente impiegata durante i clonaggi, per evitare che le estremità di un vettore tagliato con un enzima di restrizione si richiudano abbassando la

resa della reazione di ligazione. Generalmente la reazione viene preparata in modo analogo ad una digestione per quanto riguarda le quantità ed i volumi; la reazione avviene a 50°C per 60 min

Ligazione di molecole di DNA

Le molecole di DNA da legare vanno mescolate nelle proporzioni adatte (generalmente in un rapporto inserto/vettore di 3:1). Si impiega un kit di ligazione (Takara). Le molecole di DNA da legare vanno mescolate nelle proporzioni adatte rispettando un volume compreso tra i 5 e i 10 µl. Si aggiunge quindi in ghiaccio un uguale volume di “Ligation Mighty Mix” (Takara), si mescola e si incuba 30 min a 16°C.

Purificazione di prodotti di PCR con colonnine cromatografiche

Per volume di reazione di PCR si aggiungono 5 volumi di soluzione PB (Qiagen) e si mescola. La soluzione viene trasferita sulla colonnina e si centrifuga 1 min a 16000 rcf. Una volta eliminato l'eluato, si aggiungono 750 µl di soluzione di lavaggio, si centrifuga 1 min, si elimina l'eluato e si centrifuga di nuovo 1 min. Per eluire il DNA si aggiungono 30 µl di 10mM Tris-HCl pH 8,5 preriscaldato a 70°C al centro della colonna, si attende 1 min e quindi si centrifuga 1 min.

Gel purificazione di molecole di DNA

Per separare molecole di DNA di diversa dimensione si procede tipicamente ad elettroforesi in gel di agarosio (da 0,7 fino a 2% agarosio) con una differenza di potenziale di 50 V. Una volta tagliata la porzione di gel d'agarosio contenente la banda di DNA delle dimensioni volute sotto una lampada UV si recupera in eppendorf. Per l'estrazione del DNA dal gel ci si avvale di un kit di estrazione (Qiagen) si aggiungono 500-700 µl di soluzione L1 (Qiagen) per ogni 100 mg di gel. Si riscalda su un bagnetto termostato a 50°C per 10 min, mescolando spesso, finché il gel non è completamente disciolto. Si carica la colonnina QIAquick (Qiagen), si centrifuga 1 min a 16000 rcf e si

getta l'eluato. Per gel densi può essere necessario un secondo lavaggio con altri 500 µl di L1. Si getta l'eluato, si aggiungono alla colonnina 500 µl di soluzione di lavaggio L2 (ricostituita con etanolo) e si lascia incubare a RT per 5 min. Si elimina il lavaggio 2 min a 16000 rcf. Per eluire il DNA si aggiungono al centro della colonna 30 µl di di acqua o Tris (10mM Tris-HCl pH 8,5) preriscaldati a 70°C, si attende 1 min e quindi si centrifuga 2 min a 16000 rcf.

Preparazione di batteri competenti alla trasformazione

Per preparare batteri competenti alla trasformazione mediante shock termico, si inocula una coltura di E. coli del ceppo DH5α in 2ml di LB (Luria broth) (per un litro: 10 g bactotripton; 5 g estratti di lievito; 10 g sodio cloruro; acqua q.b.) e la si lascia crescere overnight. Il giorno seguente si inocula 1ml di questa coltura in 100ml di Psi broth (per un litro: 5 g estratti di lievito, 20 g bacto tripton, 5 g magnesio solfato, pH 7,6; autoclavato), quindi si procede ad incubazione a 37°C in agitazione fino ad una OD550=0,48. Dopo un'incubazione di 15 min in ghiaccio, si precipitano i batteri mediante centrifugazione a 3000-5000 rcf per 5 min a 4°C. Eliminato il surnatante, si risospende il pellet in 40 ml di soluzione TfbI (per 200 ml: 300 mM potassio acetato, 100 mM rubidio cloruro, 10 mM calcio cloruro, 50 mM manganese cloruro, 15% v/v glicerolo, pH 5,8) sterilizzata con filtri 0,2 µm e preraffreddata in ghiaccio. Dopo un'incubazione di 15 min in ghiaccio, si precipitano i batteri mediante centrifugazione a 3000-5000 rcf per 5 min a 4°C. Eliminato il surnatante, si risospende il pellet in 4 ml di soluzione TfbII (per 100 ml: 10 mM MOPS, 10 mM rubidio cloruro, 75 mM calcio cloruro, 15% v/v glicerolo, pH 6,5) sterilizzata con filtri 0,2 µm e preraffreddata in ghiaccio. Dopo una ulteriore incubazione di 15 min in ghiaccio, si possono utilizzare i batteri per una trasformazione oppure aliquotarli e conservarli a -80°C previo congelamento in azoto liquido. Generalmente si procede comunque ad una trasformazione di prova per calcolare l'efficienza di trasformazione ottenuta.

Trasformazione di batteri con DNA plasmidico tramite shock termico

In questo protocollo si utilizzano E. coli del ceppo DH5 α resi competenti con il metodo del rubidio cloruro. Si lasciano scongelare i batteri in ghiaccio, quindi si aggiungono 40 μ l di batteri ad ogni aliquota di DNA plasmidico da trasformare. Dopo una incubazione in ghiaccio che può durare da un minimo di 20 min a un massimo di 1 ora, si procede ad uno shock termico di 45 secondi per immersione in un bagnetto a 37°C; i batteri vengono quindi lasciati 2 min in ghiaccio. Si aggiungono ai batteri 500 μ l di LB senza antibiotico per la ripresa e, dopo una incubazione di 1 ora a 37°C in moderata agitazione, si piastrano 10-100-500 μ l della sospensione batterica in Petri con antibiotico per la selezione.

Minipreparazioni di DNA plasmidico

I batteri (2 ml) ottenuti da una coltura overnight vengono sedimentati in eppendorf centrifugando 30 sec a 16000 rcf. Si risospende il pellet in 250 μ l di soluzione A (100 mM Tris-Cl a pH 7,5, 10 mM EDTA, 400 g/ml RNasi A), quindi si aggiungono 250 μ l di soluzione di lisi B (1% SDS, 0,2 M NaOH) e si mescola: la soluzione a questo punto diventa limpida. Si aggiungono 350 μ l di soluzione neutralizzante C (tampone potassio acetato pH 4,8) e si mescola immediatamente, quindi si centrifuga 10 min a 16000 rcf per sedimentare i residui cellulari. Si preleva il surnatante e lo si applica a una colonnina di purificazione del tipo QIAprep (Qiagen), e si centrifuga 1 min a 16000 rcf. Eliminato l'eluato, si aggiungono 700 μ l di soluzione di lavaggio e si lascia incubare per 5 min a RT; si centrifuga 1 min, si elimina l'eluato e si centrifuga di nuovo 2 min. Per eluire il DNA si aggiungono fino a 50 μ l di soluzione di eluizione (10mM Tris-HCl pH 8,5) preriscaldati a 70°C, al centro della membrana. Infine si centrifuga per 2 min a 16000rcf per eluire e raccogliere il DNA.

In alternativa all'uso delle colonnine è possibile purificare il DNA plasmidico seguendo un diverso protocollo. Si procede come sopra fino alla sedimentazione dei residui della lisi, dopodiché si recupera il surnatante e lo si precipita con un ugual volume di isopropanolo, centrifugando 15 min a 16000 rcf. Dopo un lavaggio di 15 min in 70%

etanolo, si asciuga il pellet a 37°C o in una centrifuga speedvac. Il pellet viene risospeso in 100 µl di TE (10 mM Tris-HCl pH 8,5, 100 mM EDTA) e si procede all'estrazione delle proteine con fenolo/cloroformio (1:1) e cloroformio. Si precipita il DNA con 2,5 volumi di 100% etanolo e 0,1 volumi di 3 M sodio acetato pH 5,2. Dopo un breve lavaggio in 2,5 volumi di 70% etanolo, si asciuga il pellet a 37°C e lo si risospende, generalmente, in 20 µl di acqua.

Colture cellulari

Le linee cellulari U2OS, MCF10A, HCT-116 e B9 sono state mantenute in DMEM +10% FBS, 20mM L-glutamina, 1X penicillina/streptomicina. La linea HepG2 è stata mantenuta in MEM/earl's salts +10%FBS, 40mM L-glutamina, 1X pen/strep, 1X aminoacidi non essenziali. La linea MDA-MB-231 è stata mantenuta in DMEM/F12 +10% FBS, 20mM L-glutamina, 1X penicillina/streptomicina.

BIBLIOGRAFIA

- Afshar K, Gonczy P, DiNardo S, Wasserman SA: fumble encodes a pantothenate kinase homolog required for proper mitosis and meiosis in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 2001; 157: 1267-76
- Agius, E., Oelgeschlager, M., Wessely, O., Kemp, C. & De Robertis, E. M. Endodermal Nodal- related signals and mesoderm induction in *Xenopus*. *Development* 127, 1173-83 (2000).
- Bartel DP: MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-97
- Basso K, Margolin AA, Stolovitzky G, Klein U, Dalla-Favera R, Califano A: Reverse engineering of regulatory networks in human B cells. *Nat Genet* 2005; 37: 382-90
- Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, Mills AA, Elledge S J , Anderson KV, Hannon GJ: Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* 2003; 35: 215-7
- Blenkiron C, Miska EA: miRNAs in cancer: approaches, aetiology, diagnostics and therapy. *Hum Mol Genet* 2007; 16 Spec No 1: R106-13
- Budhu A, Jia HL, Forgues M, Liu CG, Goldstein D, Lam A, Zanetti KA, Ye QH, Qin LX, Croce CM, Tang ZY, Wang XW: Identification of metastasis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 47: 897-907
- Burk U, Schubert J, Wellner U, Schmalhofer O, Vincan E, Spaderna S, Brabletz T: A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO Rep* 2008; 9: 582-9
- Calabrese J M, Amy C Seila, Gene W Yeo, Phillip A Sharp: RNA sequence analysis defines Dicer's role in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104 (46): 18097-102
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM: Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 15524-9
- Cha, Y. R., Takahashi, S. & Wright, C. V. Cooperative non-cell and cell autonomous regulation of Nodal gene expression and signaling by Lefty/Antivin and Brachyury in *Xenopus*. *Dev Biol* 290, 246-64 (2006).
- Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS: MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 2005; 65: 6029-33

- Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP: MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004; 303: 83-6
- Chen, X. et al. Smad4 and FAST-1 in the assembly of activin-responsive factor. *Nature* 389, 85-9 (1997).
- Cordenonsi, M. et al. Integration of TGF-beta and Ras/MAPK Signaling Through p53 Phosphorylation. *Science* 315, 840-43 (2007).
- Davis et al. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* 2008; 454: 56-61
- De Robertis, E. M., Larrain, J., Oelgeschlager, M. & Wessely, O. The establishment of Spemann's organizer and patterning of the vertebrate embryo. *Nat Rev Genet* 1, 171-81 (2000).
- Eisenberg E, Levanon EY: Human housekeeping genes are compact. *Trends Genet* 2003;19: 362-5
- Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E: Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 2008; 132: 9-14
- Fan C, Oh DS, Wessels L, Weigelt B, Nuyten DS, Nobel AB, van't Veer LJ, Perou CM: Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med* 2006; 355: 560-9
- Faure, S., Lee, M. A., Keller, T., ten Dijke, P. & Whitman, M. Endogenous patterns of TGFbeta superfamily signaling during early *Xenopus* development. *Development* 127, 2917-31 (2000).
- Feng, X. H. & Derynck, R. Specificity and versatility in TGF-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 659-93 (2005).
- Ge X, Yamamoto S, Tsutsumi S, Midorikawa Y, Ihara S, Wang SM, Aburatani H: Interpreting expression profiles of cancers by genome-wide survey of breadth of expression in normal tissues. *Genomics* 2005; 86: 127-41
- Giraldez AJ, Cinalli RM, Glasner ME, Enright AJ, Thomson JM, Baskerville S, Hammond SM, Bartel DP, Schier AF: MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science* 2005; 308: 833-8
- 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
- Guo Y, Chen Z, Zhang L, Zhou F, Shi S, Feng X, Li B, Meng X, Ma X, Luo M, Shao K, Li N, Qiu B, Mitchelson K, Cheng J, He J: Distinctive microRNA profiles relating to patient survival in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2008; 68: 26-33

- He L, Hannon GJ: MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 2004; 5: 522-31
- Heasman, J., Kofron, M. & Wylie, C. Beta-catenin signaling activity dissected in the early *Xenopus* embryo: a novel antisense approach. *Dev Biol* 222, 124-34 (2000).
- Heasman, J. et al. Overexpression of cadherins and underexpression of beta-catenin inhibit dorsal mesoderm induction in early *Xenopus* embryos. *Cell* 79, 791-803 (1994).
- 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, Pure E, Agami R : The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 202-10
- Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Menard 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: 7065-70
- John, B. et al. Human MicroRNA targets. *PLoS Biol* 2, e363 (2004).
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ: RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 2005; 120: 635-47
- Kanellopoulou C, Muljo SA, Kung AL, Ganesan S, Drapkin R, Jenuwein T, Livingston D M , Rajewsky K: Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev* 2005; 19: 489-501
- Karube Y, Tanaka H, Osada H, Tomida S, Tatematsu Y, Yanagisawa K, Yatabe Y, Takamizawa J, Miyoshi S, Mitsudomi T, Takahashi T: Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci* 2005; 96: 111-5
- Kenny PA, Lee GY, Myers CA, Neve RM, Semeiks JR, Spellman PT, Lorenz K, Lee EH, Barcellos-Hoff MH, Petersen OW, Gray JW, Bissell MJ: The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Mol Oncol* 2007; 1: 84-96
- Korpal 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: 14910-4
- Krek, A. et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 37, 495-500 (2005).
- Krutzfeldt, J., Poy, M. N. & Stoffel, M. Strategies to determine the biological function of microRNAs. *Nat Genet* 38 Suppl, S14-9 (2006).

- Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M: Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 2005; 438: 685-9
- Lagna G, Hata A, Hemmati-Brivanlou and Massague J. Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways. *Nature* 383: 832-6
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VM: The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; 425: 415-9
- 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: 834-8
- Ma L, Weinberg RA: Micromanagers of malignancy: role of microRNAs in regulating metastasis. *Trends Genet* 2008; 24: 448-56
- Martello G, Zacchigna L, Inui M, Montagner M, Adorno M, Mamidi A, Morsut L, Soligo S, Tran U, Dupont S, Cordenonsi M, Wessely O, Piccolo S: MicroRNA control of Nodal signalling. *Nature* 2007; 449: 183-8
- Massague, J. How cells read TGF-b signals. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 169–178 (2000).
- Murchison EP, Stein P, Xuan Z, Pan H, Zhang MQ, Schultz RM, Hannon GJ: Critical roles for Dicer in the female germline. *Genes Dev* 2007; 21: 682-93
- Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe JP, Tong F, Speed T, Spellman PT, DeVries S, Lapuk A, Wang NJ, Kuo WL, Stilwell JL, Pinkel D, Albertson DG, Waldman FM, McCormick F, Dickson RB, Johnson MD, Lippman M, Ethier S, Gazdar A, Gray JW: A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 2006; 10: 515-27
- Niehrs, C. Regionally specific induction by the Spemann-Mangold organizer. *Nat Rev Genet* 5, 425-34 (2004).
- Norris, D. P. & Robertson, E. J. Asymmetric and node-specific nodal expression patterns are controlled by two distinct cis-acting regulatory elements. *Genes Dev* 13, 1575-88 (1999).
- Park SM, 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
- Piccolo, S. et al. The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* 397, 707-10 (1999).
- Pogoda, H. M., Solnica-Krezel, L., Driever, W. & Meyer, D. The zebrafish forkhead transcription factor FoxH1/Fast1 is a modulator of nodal signaling required for organizer formation. *Curr Biol* 10, 1041-9 (2000).

- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Bettinger, J.C., Pasquinelli A.E., Rougvie, A.E., Horvitz H.R., and Ruvkun, G. The 21 nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000 403, 901–906.
- Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, Falconi M, Capelli P, Bersani S, Calin GA, Volinia S, Liu CG, Scarpa A, Croce CM: MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4677-84
- Shi, R. & Chiang, V. L. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. *Biotechniques* 39, 519-25 (2005).
- Schohl, A. & Fagotto, F. Beta-catenin, MAPK and Smad signaling during early *Xenopus* development. *Development* 129, 37-52 (2002).
- Siegel, P. M. & Massague, J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 3, 807-21 (2003).
- Simpson JF, Gray R, Dressler LG, Cobau CD, Falkson CI, Gilchrist KW, Pandya KJ, Page DL, Robert NJ: Prognostic value of histologic grade and proliferative activity in axillary node-positive breast cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Companion Study, EST 4189. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2059-69
- Song, J. et al. The type II activin receptors are essential for egg cylinder growth, gastrulation, and rostral head development in mice. *Dev Biol* 213, 157-69 (1999).
- Sorlie 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 Lonning P, Borresen-Dale AL: Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 10869-74
- Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, Gerald WL, Massague : Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature* 2008; 451: 147-52
- Ting AH, Suzuki H, Cope L, Schuebel KE, Lee BH, Toyota M, Imai K, Shinomura Y, Tokino T, Baylin SB: A requirement for DICER to maintain full promoter CpG island hypermethylation in human cancer cells. *Cancer Res* 2008; 68: 2570-5
- Tao, Q. et al. Maternal wnt11 activates the canonical wnt signaling pathway required for axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 120, 857-71 (2005).
- van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, van der Velde T, Bartelink H, Rodenhuis S, Rutgers ET, Friend SH, Bernards R: A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347: 1999-2009

- Vize, P. D. DNA sequences mediating the transcriptional response of the Mix.2 homeobox gene to mesoderm induction. *Dev Biol* 177, 226-31 (1996).
- 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 U S A* 2006; 103: 2257-61
- Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, Gillis AJ, Stoop H, Nagel R, Liu YP, van Duijse J, Drost J, Griekspoor A, Zlotorynski E, Yabuta N, De Vita G, Nojima H, Looijenga LH, Agami R: A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell* 2006; 124: 1169-81
- Watanabe, T. et al. Stage-specific expression of microRNAs during *Xenopus* development. *FEBS Lett* 579, 318-24 (2005).
- Wrana JL, Attisano L, Carcamo J, Zentella A, Doody M, Laiho M, Wang XF and Massague J. TGF beta singals through a heteromeric protein kinase receptorcomplex. *Cell* 1992. 71: 1003-14
- Yeom KH, Lee Y, Han J, Suh MR, Kim VN: Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: 4622-9
- Zhang W, Dahlberg JE, Tam W: MicroRNAs in tumorigenesis: a primer. *Am J Pathol* 2007; 171: 728-38

FIGURE

Figura 1

a, Genesi dei microRNA: i pri-miRNA, trascritti a partire dalle sequenze genomiche (1), sono processati nel nucleo da Drosha in pre-miRNA di circa 70 nucleotidi (2). I pri-miRNA sono traslocati da Exportin-5 nel citoplasma (3) dove sono processati da Dicer in miRNA:miRNA* *duplexes* (4).

Il filamento con estremità 5' meno stabile entra preferenzialmente a far parte del RISC (5); quest'ultimo viene guidato dal miRNA all'interazione con l'mRNA bersaglio.

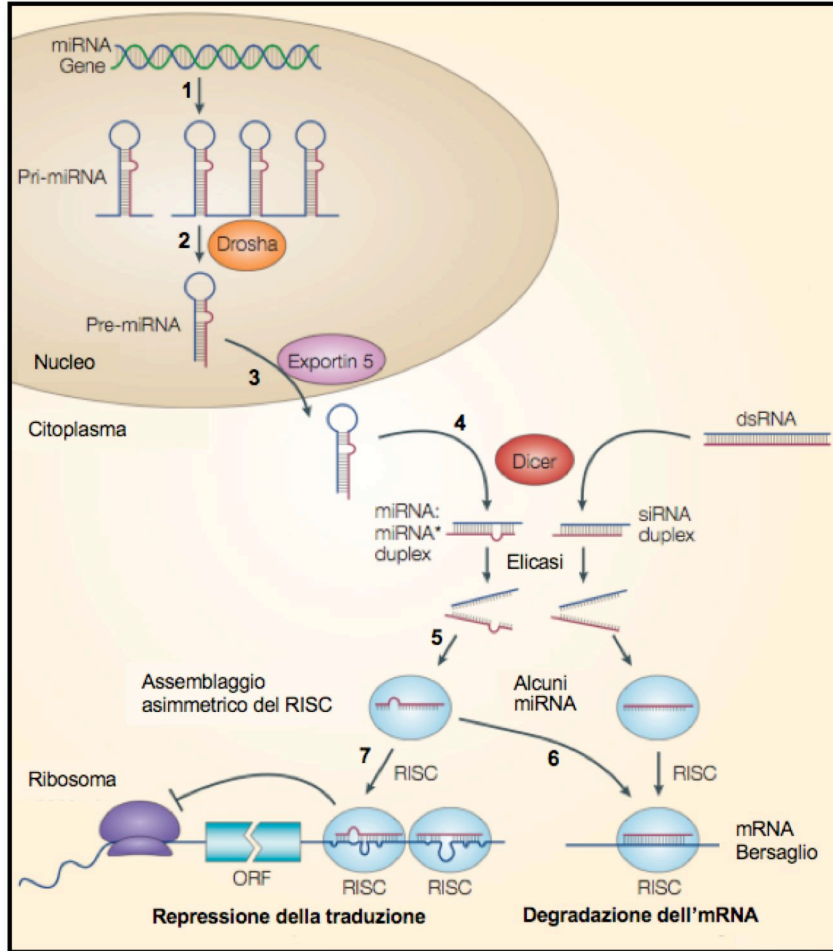
Sulla base del grado di complementarità con l'miRNA il bersaglio viene degradato (6) o ne viene impedita la traduzione (7).

In figura è indicata anche la via di biogenesi degli siRNA, i quali originano da lunghe molecole di dsRNA processate da Dicer (He and Hannon, 2004).

b, La via di segnale di Transforming Growth Factor- β (TGF- β): i ligandi TGF- β legano sulla superficie cellulare due recettori dotati di attività serin-treonina chinasi (recettori di tipo I e II) (Wrana et al., 1992). L'interazione tra i due recettori porta all'attivazione, mediante fosforilazione, delle Smad Recettoriale (R-Smad), mediatori intracellulari del segnale. Le R-Smad a questo punto legano Smad4 (definita co-Smad, Lagna et al., 1996) e traslocano al nucleo, dove regoleranno l'espressione di specifici geni bersaglio.

Figura 1

a



b

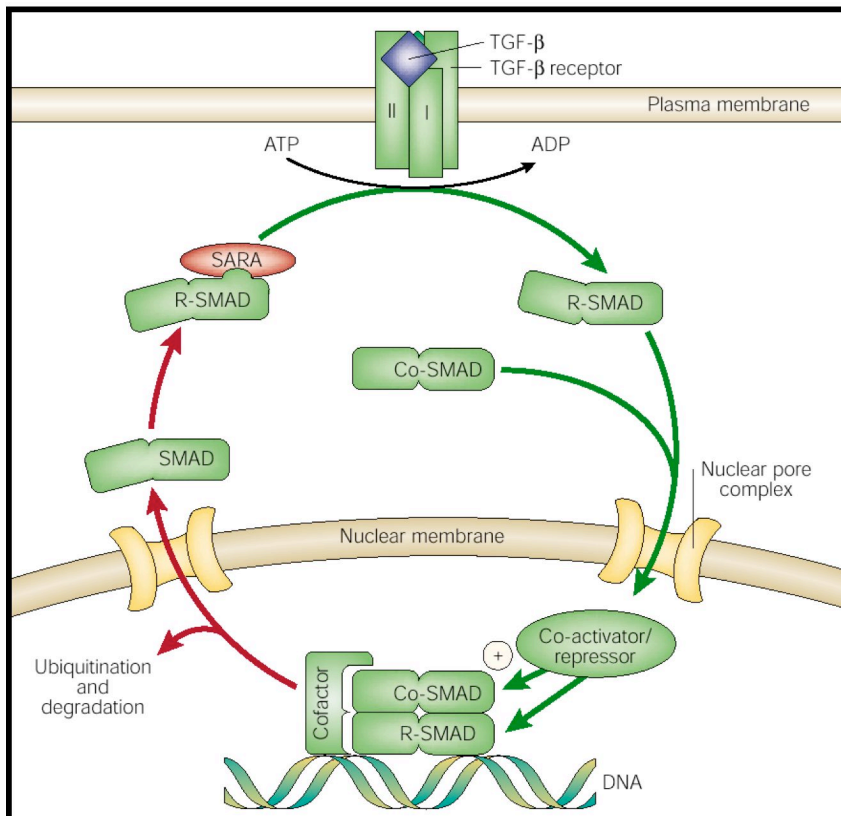


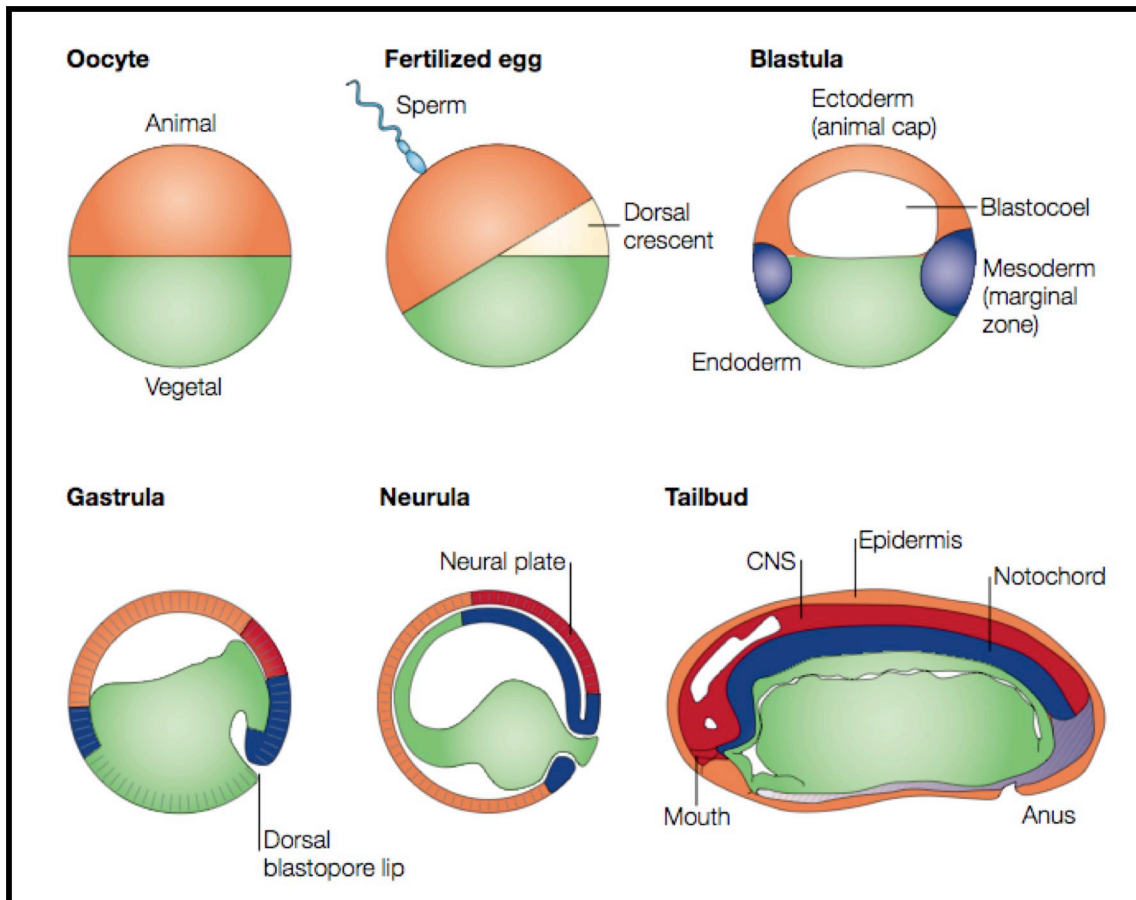
Figura 2

a, Prime fasi dello sviluppo in *Xenopus laevis*: l'ovocita presenta una simmetria radiale ed è diviso nel dominio animale, più pigmentato, e quello vegetale. La fecondazione rompe questa iniziale simmetria, infatti il sito d'ingresso dello spermatozoo sarà il futuro lato ventrale nell'adulto. Segue poi una fase di rapida divisione cellulare durante la quale compare una cavità, detta blastocele, che definisce lo stadio di Blastula. E' a questo stadio che i tre foglietti germinativi, ectoderma, mesoderma ed endoderma, sono definiti. Al successivo stadio di Gastrula inizia l'involuzione del mesoderma verso l'interno dell'embrione, evidenziando così il labbro dorsale del blastoporo. Questi movimenti morfogenetici permettono il corretto posizionamento dei foglietti germinativi e la formazione degli assi corporei. Allo stadio di Neurula il futuro sistema nervoso, chiamato piastra neurale, viene indotto a livello dell'ectoderma dorsale. Infine allo stadio di Tailbud sono evidenti le strutture della testa, del sistema nervoso e muscolare.

b, L'Organizzatore di Spemann, un tessuto localizzato nel mesoderma dorsale allo stadio di Gastrula, è responsabile dei movimenti morfogenetici richiesti per la formazione degli assi corporei e del sistema nervoso. La fecondazione causa un aumento di segnale Wnt/ β -catenina del futuro lato dorsale dell'embrione. L'accumulo di β -catenina viene poi tradotto, mediante meccanismi non noti, in un accumulo di segnale Nodal nel lato dorsale dell'embrione a Blastula. Nodal è un ligando TGF- β , il cui legame ai recettori porta alla fosforilazione di Smad2. L'attività di Nodal in questo contesto è l'induzione del mesoderma, ma in particolare, nella porzione dorsale del mesoderma, vi sono alti livelli di Nodal che portano alla formazione dell'Organizzatore.

Figura 2

a



b

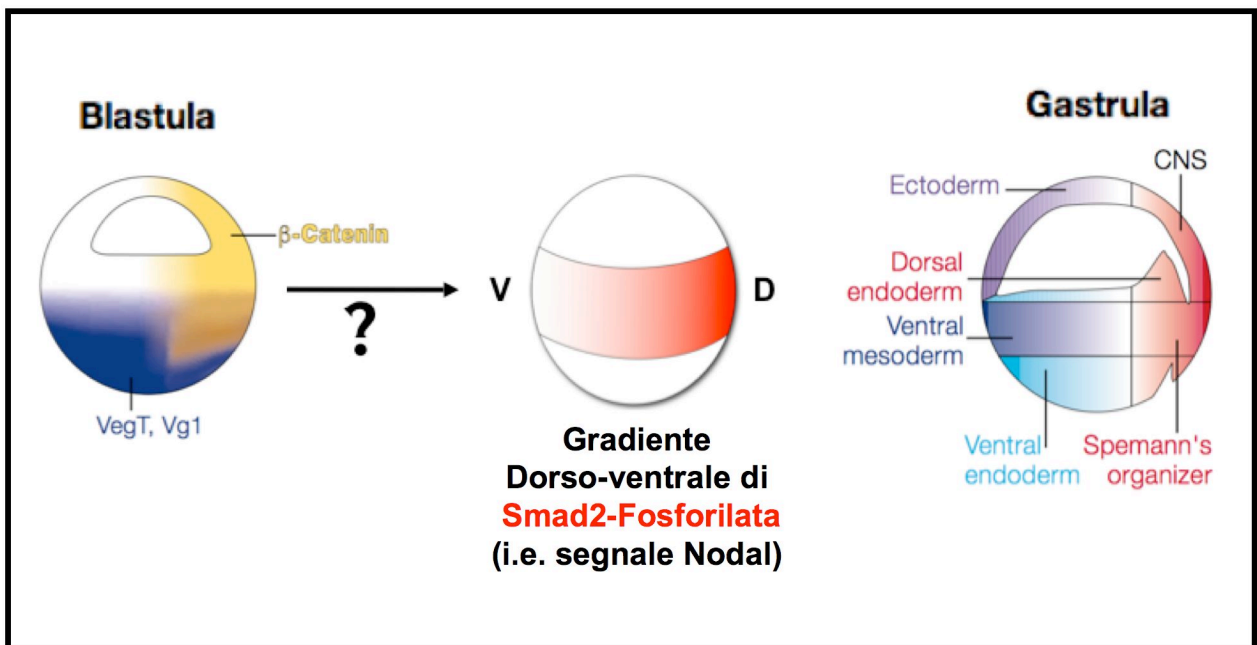


Figura 3

a, Embrioni di *Xenopus* sono stati iniettati nel polo animale con il reporter *Mix.2-lux* con (barre nere) o senza (barre bianche) 30 pg di mRNA di *Xnr-1* (Nodal). L'attività di Nodal (colonna 1) è inibita dalla co-iniezione di 3 ng (colonna 2) di microRNA endogeni purificati da embrioni allo stadio di Gastrula. La co-iniezione di piccoli RNA di controllo (12 ng) non ha alcun effetto (colonna 3). CerS è un noto inibitore di Nodal e serve da controllo positivo (colonna 4). Low MW, low molecular weight, ossia < 100 nucleotidi.

b, miR-15 e miR-16 appartengono alla famiglia di microRNA di miR-15, poiché hanno la medesima sequenza "seed" (AGCAGCA), necessaria al riconoscimento del bersaglio. Essi originano da un unico trascritto primario bicistronico (pri-miR-15/16). Nel genoma di *Xenopus* vi sono 3 diversi loci per miR-15/16, e due nel genoma umano. Da ogni locus viene codificata una copia di miR-15 e una di miR-16. Sono riportate le sequenze dei microRNA miR-15 e miR-16 maturi; in grassetto le sequenze seed.

c, In alto sono riportati l'appaiamento predetto tra *Xenopus* miR-15a e miR-16a ed il primo e secondo sito bersaglio nel 3'UTR di *ACVR2a*. L'allineamento di sequenze in basso mostra la conservazione evolutiva dei due siti di legame per miR-15/16 nel 3'UTR di *ACVR2a*.

d, Rappresentazione schematica dei plasmidi reporter usati per misurare l'attività di miR-15/16 sul 3'UTR di *ACVR2a*. Il promotore CMV guida l'espressione costitutiva di un mRNA chimerico, contenente la sequenza codificante la luciferasi e un sito di legame per miR-15/16 proveniente dal 3'UTR di *ACVR2a* (*ACVR2a-wt*), o lo stesso sito mutato (*ACVR2a-mut*). La mutazione nella regione complementare al seed dovrebbe abolire il legame di miR-15/16. L'appaiamento tra miR-15 (in grassetto) e i due plasmidi è mostrato. Gli asterischi evidenziano i nucleotidi mutati in *ACVR2a-mut*.

e, Il sito di legame per miR-15/16 predetto nel 3'UTR di *ACVR2a* è inibito da microRNA endogeni; la sovraespressione di miR-15 maturo (15 ng) o il precursore pri-miR-15/16 (7 ng), porta ad una ulteriore inibizione. Gli embrioni sono stati iniettati radialmente nella zona marginale con 40 pg dei soli plasmidi reporter (colonne 1 e 4) o in combinazione con i microRNA indicati. I grafici rappresentano esperimenti rappresentativi, eseguiti almeno tre volte indipendentemente. Le barre di errore mostrano la deviazione standard.

f, In alto: Western blotting (WB) per l'endogena *ACVR2a* da lisati di *Xenopus*. La sovraespressione di miR-15, rispetto ad un piccolo RNA di controllo, riduce i livelli proteici di *ACVR2a*. β -catenina funge da controllo di caricamento. In basso: RT-PCR di *ACVR2a*. miR-15 non influenza i livelli di mRNA di *ACVR2a*. ODC funge da controllo di caricamento.

g, Western blotting (WB) per l'endogena *ACVR2a* da lisati di cellule umane HepG2. La sovraespressione di miR-15 riduce i livelli proteici di *ACVR2a*. β -catenina funge da controllo di caricamento.

Figura 4

a, La trascrizione del reporter *Mix.2-lux*, iniettato nella zona marginale di embrioni allo stadio di 4 cellule, dipende dal segnale Nodal endogeno. Pri-miR-15/16 e miR-15 maturo inibiscono questa risposta (colonne 2 e 4), ma non un pri-miR di controllo (colonna 1) o miR-15 mutato (miR15-MUT, colonna 3). *CerS* è un noto antagonista di Nodal (Piccolo et al., 1999) e serve da controllo positivo.

b, La trasfezione di miR-15 maturo in cellule umane HepG2 inibisce la risposta ad Activin (1 ng/ml, colonne 1 e 2). La co-trasfezione di ACVR2a privo del 3'UTR recupera la normale risposta ad Activin (colonna 3). La trasfezione di un siRNA contro ACVR2a fenocopia la sovraespressione di miR-15 (colonne 4 e 5). Le barre in bianco indicano i campioni non trattati, quelle in nero i campioni trattati con Activin. AU: unità arbitrarie. I grafici rappresentano esperimenti rappresentativi, eseguiti almeno tre volte indipendentemente. Le barre di errore mostrano la deviazione standard.

c, Ibridazione *in situ* di geni espressi dall'Organizzatore di Spemann (*Chd* and *Paintallavis*), su embrioni allo stadio di Gastrula. La sovraespressione di miR-15 riduce l'espressione dei geni dell'Organizzatore. miR-15-MUT è stato iniettato come controllo. La co-iniezione di ACVR2a privo del 3'UTR (150 pg) recupera la normale espressione genica. Gli embioni sono mostrati dal lato vegetale, con la parte dorsale in alto.

d, Ibridazione *in situ* di geni espressi dall'Organizzatore di Spemann (*Xantivin*) o da tutto il mesoderma (*Xbra*), su embrioni allo stadio di Gastrula. La sovraespressione di miR-15 riduce la loro espressione. miR-15-MUT è stato iniettato come controllo. Gli embioni sono mostrati dal lato vegetale, con la parte dorsale in alto.

e, Ibridazione *in situ* di geni espressi dall'Organizzatore di Spemann (*Chd* and *Paintallavis*), su embrioni allo stadio di Gastrula. La sovraespressione di miR-15 riduce l'espressione dei geni dell'Organizzatore. miR-15-MUT è stato iniettato come controllo. La co-iniezione di Smad2 (200 pg) aumenta l'espressione dei geni dell'Organizzatore, e questo effetto non è influenzato da miR-15. Gli embioni sono mostrati dal lato vegetale, con la parte dorsale in alto.

Figura 4

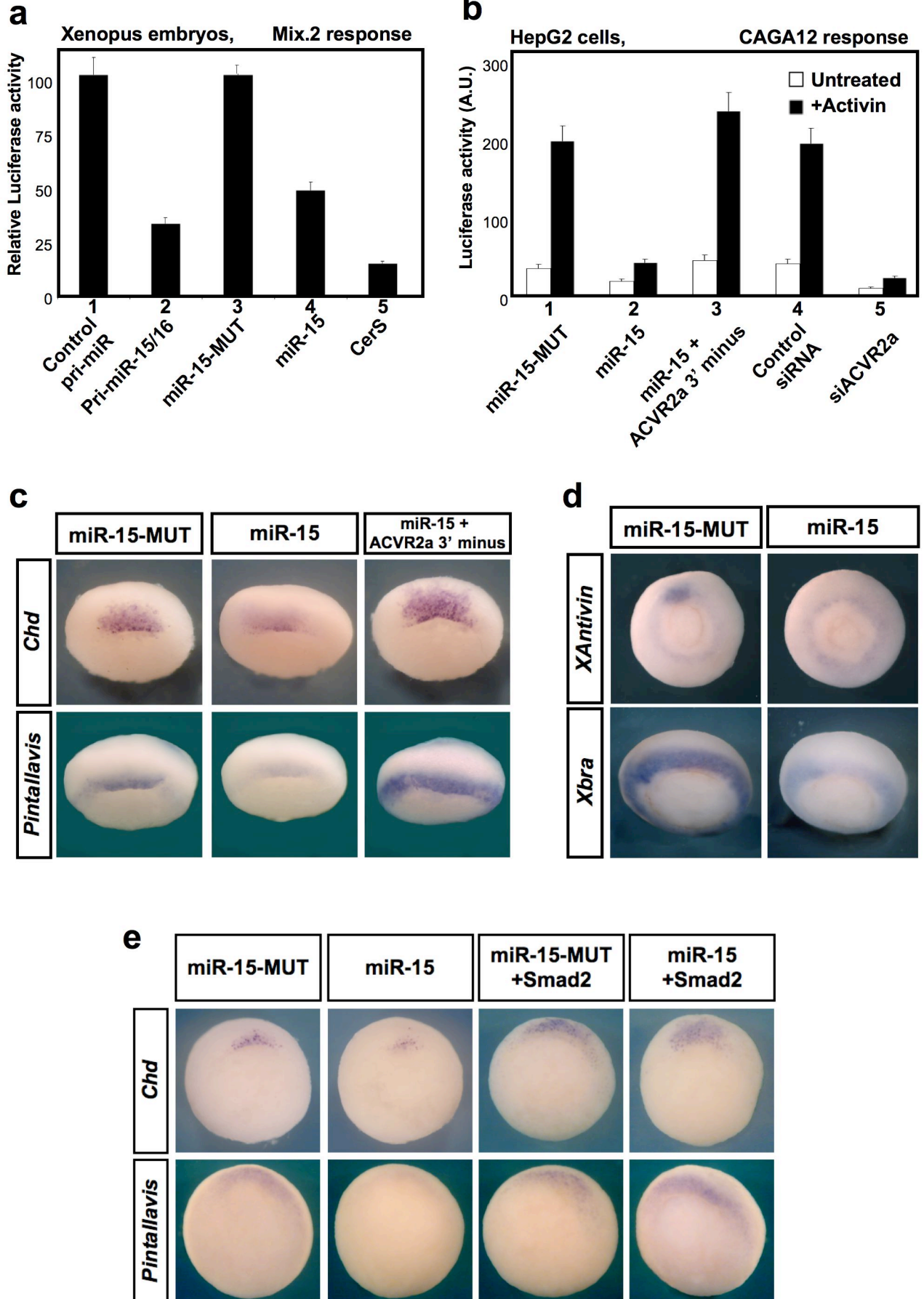


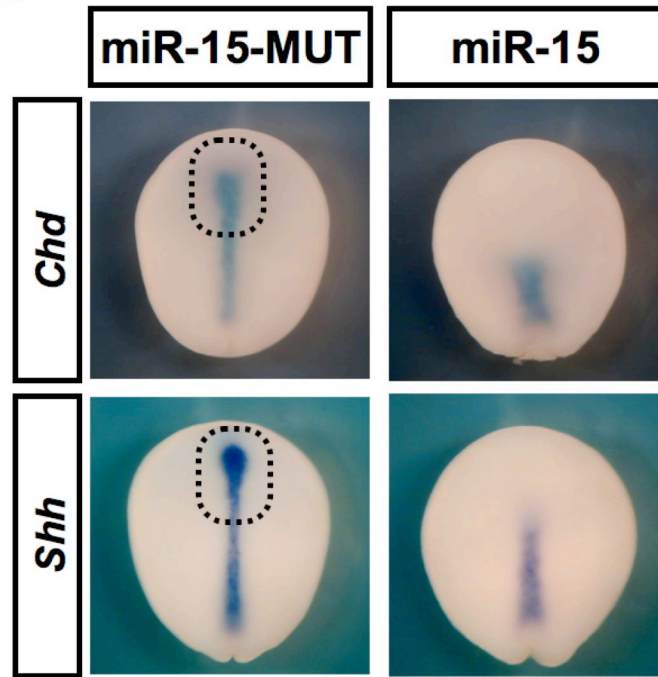
Figura 5

a, Ibridazione *in situ*, in embrioni allo stadio di Neurula, per i geni *Chd* e *Shh*: la piastra precordale (evidenziata dalla linea tratteggiata), una struttura anteriore derivante dall'Organizzatore, non si forma in embrioni in cui miR-15 viene sovraespresso. Gli embrioni sono mostrati dal lato dorsale, con la parte anteriore in alto.

b, Effetti fenotipici tardivi della sovraespressione di miR-15. Si nota una riduzione delle strutture anteriori (*Pax6* marca l'occhio, *XBF-1* marca il telencefalo) in favore delle strutture posteriori/ventrali (*Sizzled*).

Figura 5

a



b

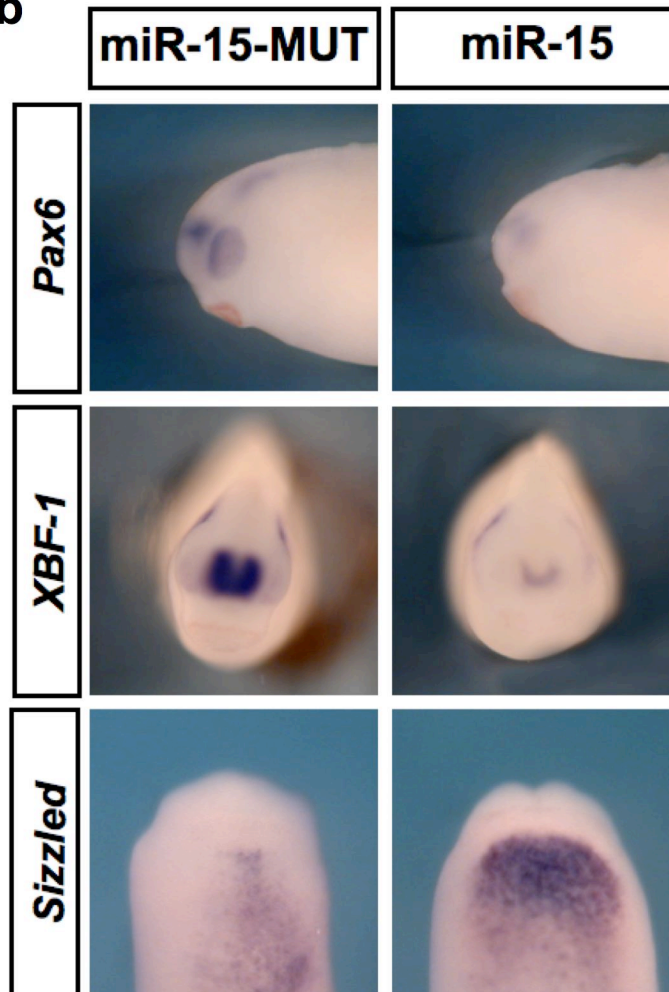


Figura 6

a, Effetto dell'inattivazione di miR-15 e miR-16 mediante i reagenti antimiR (14 ng, un mix 1:1 degli antimiR-16 e -15 è stato iniettato radialmente allo stadio di 4 cellule) sull'espressione dei reporter ACVR2a-wt e -mut: compara colonna 4 e 3, l'inibizione degli endogeni miR-15/16 aumenta la traduzione di ACVR2a.

b, Effetto dell'inattivazione di miR-15 e miR-16 sul segnale Nodal endogeno: l'inattivazione di miR-15/16 aumenta la risposta al segnale Nodal, monitorato con il reporter *Mix.2-lux* come in Figura 4a. I grafici riportano esperimenti rappresentativi, eseguiti almeno tre volte indipendentemente. Le barre di errore mostrano la deviazione standard.

c, La microiniezione di antimiR-15/16 causa una espansione ed un rafforzamento dell'espressione di geni dell'Organizzatore (*Chd*, *ADMP*, *Pintallavis*, *XAntivin*) rispetto a embrioni iniettati con un antimiR di controllo. Gli embrioni sono mostrati dal lato vegetale, con la parte dorsale in alto.

Figura 6

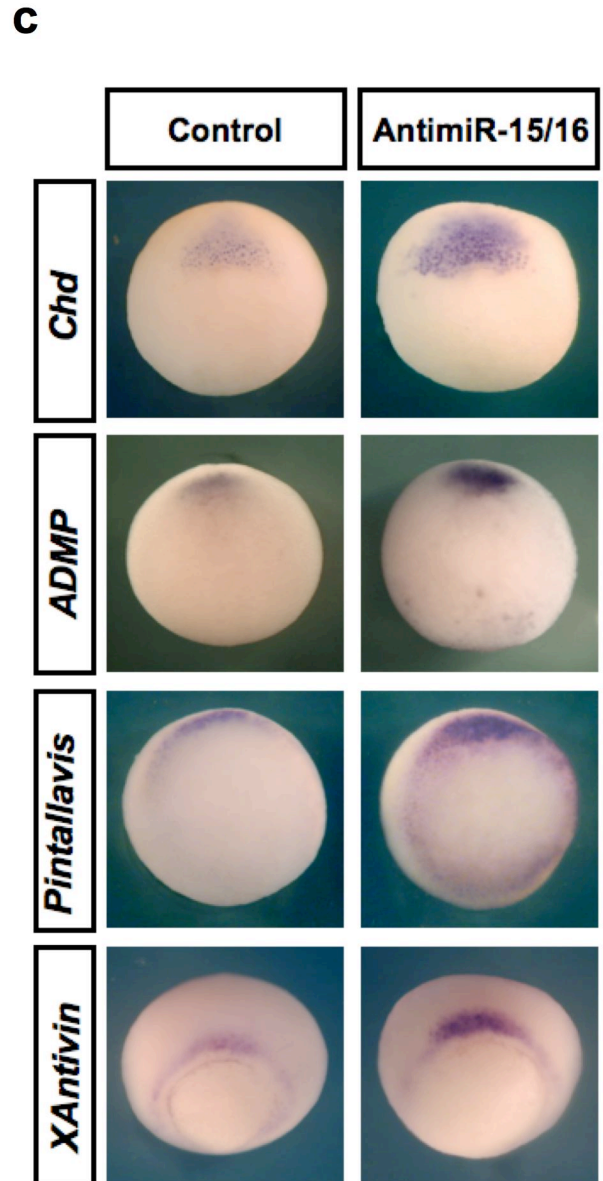
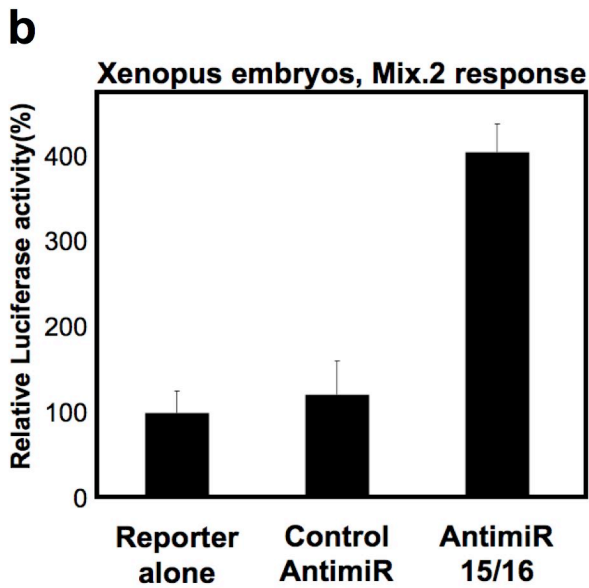
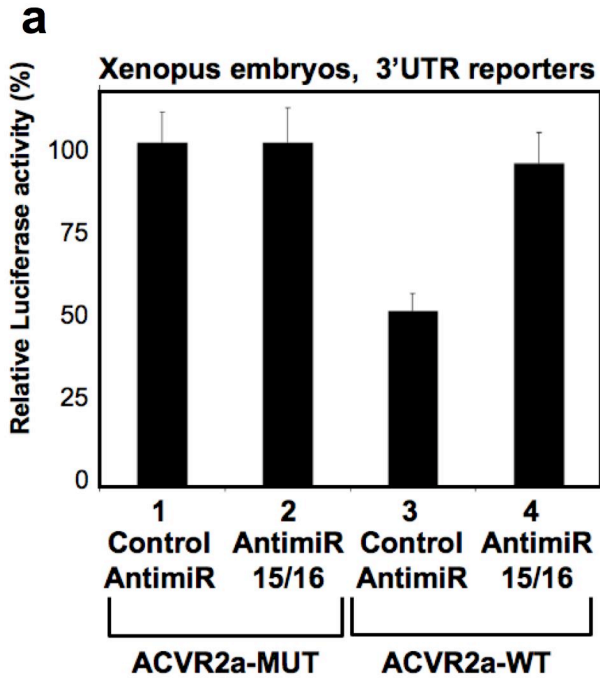


Figura 7

a, L'inibizione di miR-15/16, mediante oligonucleotidi Morpholino, causa una espansione ed un rafforzamento dell'espressione di geni dell'Organizzatore (*Chd*, *ADMP*, *Pintallavis*, *Xnr2*) rispetto a embrioni iniettati con un Morpholino di controllo. Gli embrioni sono mostrati dal lato vegetale, con la parte dorsale in alto.

b, Effetto dell'inattivazione di miR-15 e miR-16 sul segnale Nodal endogeno: l'inattivazione di miR-15/16 aumenta la risposta al segnale Nodal, monitorato con il reporter *Mix.2-lux* come in Figura 6b. I grafici riportano esperimenti rappresentativi, eseguiti almeno tre volte indipendentemente. Le barre di errore mostrano la deviazione standard.

c, Effetto fenotipico dell'inibizione di miR-15/16 a stadi più avanzati. Allo stadio di Neurula si osserva un'espansione del territorio neurale, marcato dal gene *Sox2*. Successivamente le strutture anteriori, come l'occhio (*Pax6*) e la ghiandola del cemento (xAG) risultano ingrandite, in accordo con una aumentata attività dell'Organizzatore.

Figura 7

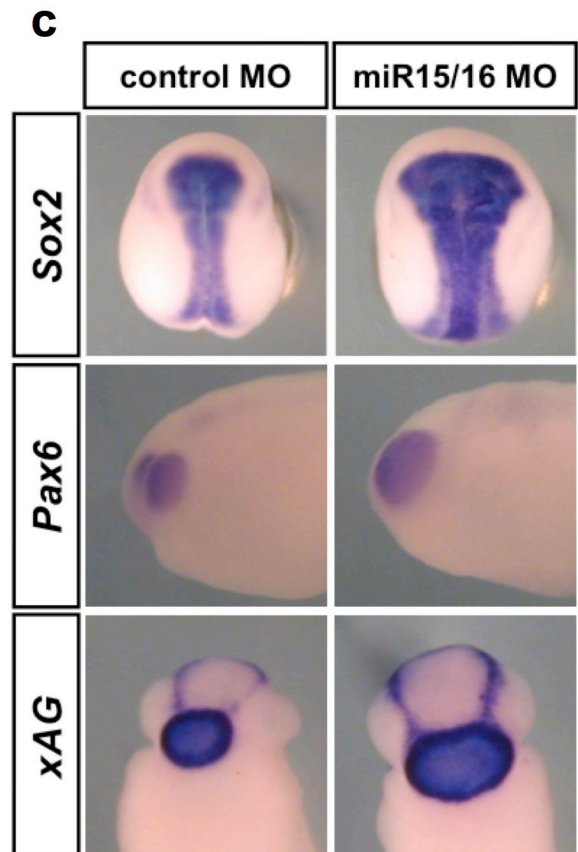
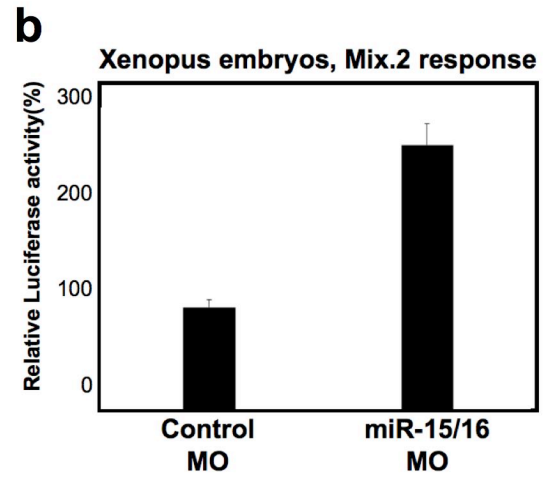
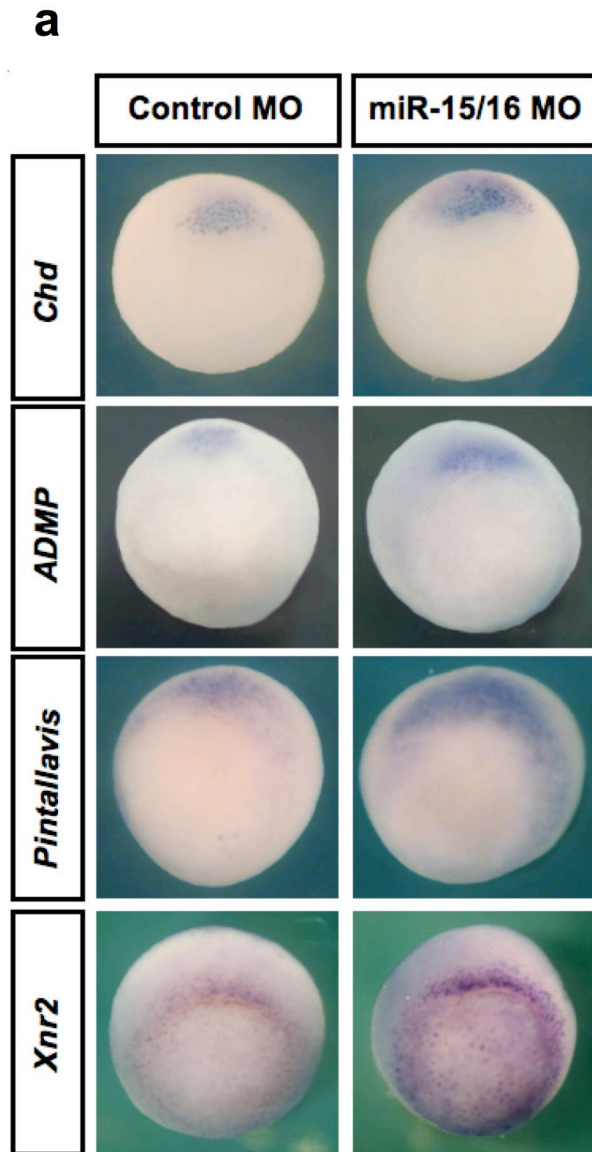


Figura 8

a, Schema della distribuzione asimmetrica di Smad2 fosforilata (p-Smad2) nel mesoderma di *Xenopus* allo stadio di blastula (Faure et al., 2000; Schohl et al., 2002) (D, lato Dorsale; V, lato Ventrale). p-Smad2 è un read-out diretto del segnale Nodal.

b, Misura dei livelli endogeni di miR-15/16 mediante RT-PCR su espianti dorsali e ventrali di embrioni allo stadio di blastula. I miRNA maturi sono arricchiti ventralmente (in basso), mentre il loro precursore primario è distribuito uniformemente (in alto). EF1-a e miR-214 sono stati usati come controlli di caricamento.

c, I reporter ACVR2a-wt e -mut sono stati iniettati solamente nei blastomeri dorsali o ventrali in embrioni allo stadio di 4 cellule. L'attività endogena di miR-15/16 è arricchita nella parte ventrale.

d, In alto: Western blotting per la proteina endogena ACVR2a da espianti Dorsali, Laterali e Ventrali di mesoderma. ACVR2a è chiaramente arricchita nel mesoderma dorsale dell'embrione allo stadio di Gastrula precoce. β -catenina è un controllo di caricamento. In basso: localizzazione immunoistochimica di ACVR2a in sezioni sagittali di embrioni allo stadio di Gastrula precoce. Le linee tratteggiate in rosso evidenziano il mesoderma ventrale (a SX) e dorsale (a DX), nel quale ACVR2a è arricchito.

e, Western blotting per Smad2 fosforilata (P-Smad2) in espianti dorsali (D) e ventrali (V) (Faure et al., 2000). P-Smad2 è arricchita dorsalmente, ma questa asimmetria viene persa in seguito alla microiniezione di pri-miR-15; i livelli ventrali di P-Smad2 vengono aumentati in embrioni iniettati con antimir-15/16. Smad2 totale serve come controllo di caricamento.

f, Modello delle distribuzioni complementari di miR-15/16 e ACVR2a.

Figura 8

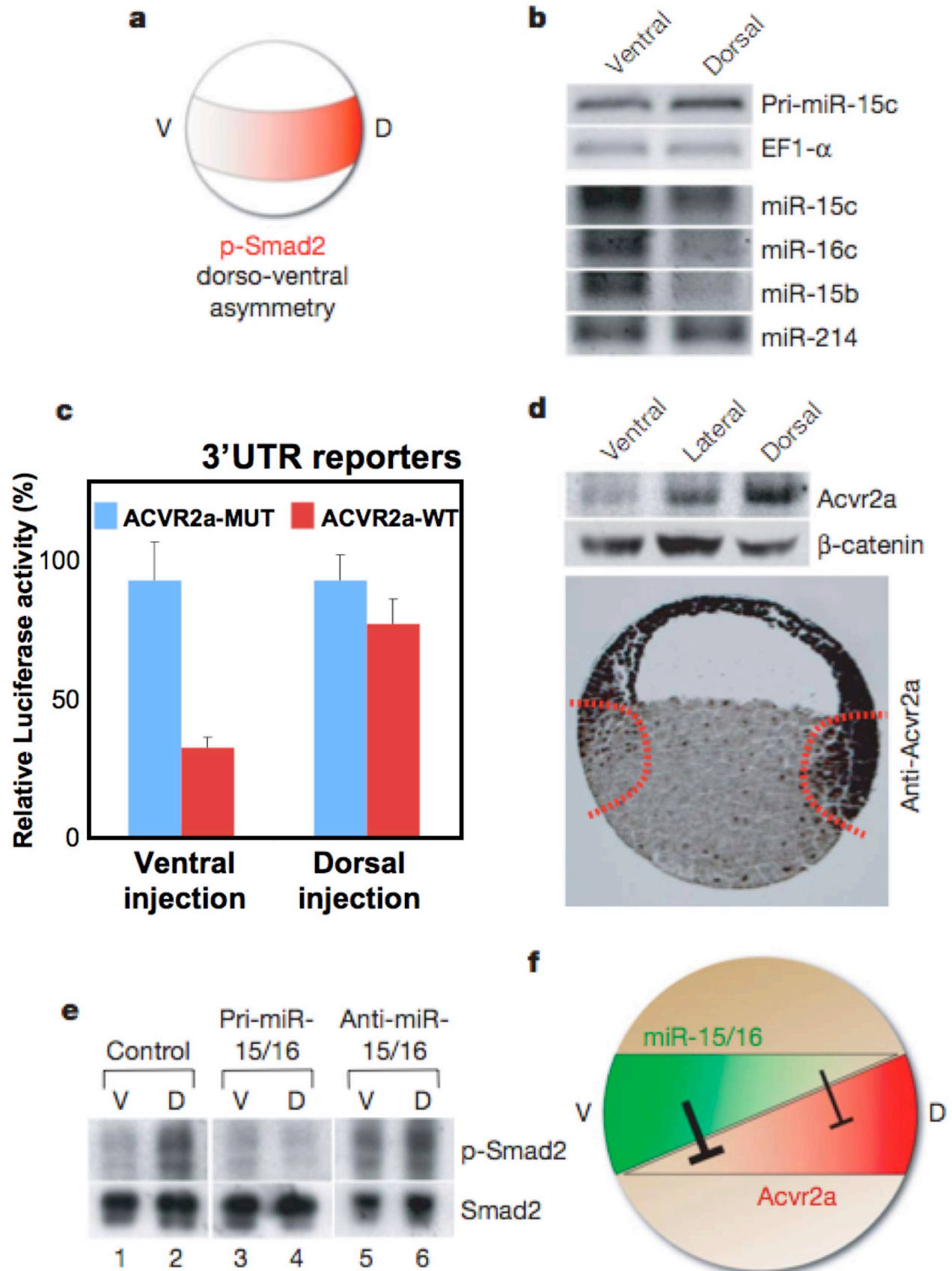


Figura 9

a, RT-PCR per la rilevazione dei microRNA maturi della famiglia miR-15, in embrioni iniettati con 200 pg di mRNA per β -catenina o 100 pg di *Wnt8*. I controlli non sono stati iniettati. Il segnale Wnt/ β -catenina riduce l'espressione di miR-15/16 maturi. In basso vi sono i controlli di caricamento: U2 è un snRNA e miR-214 è un microRNA non correlato a miR-15. I controlli -PAP (PolyA-polimerase, vedi Materiali e Metodi) assicurano l'amplificazione specifica dei maturi microRNA. 39 cicli di PCR. Come mostrato in Figura 3b in *Xenopus* la famiglia miR-15 comprende anche miR-15a/16a, ma questi non sono espressi allo stadio preso in analisi, ossia quello di Gastrula.

b, La sovraespressione di β -catenina o Wnt inibisce l'attività degli endogeni miR15/16, monitorata mediante i reporter ACVR2a 3'UTR (vedi Materiali e Metodi). La traduzione del reporter ACVR2a-wt è normalmente ridotta del 50% rispetto a ACVR2a-mut (vedi Figure 3e o 6a), a causa di miR-15/16 endogeni, ma in presenza di β -catenina o Wnt la riduzione percentuale è di circa il 20%.

c, RT-PCR per la rilevazione dei microRNA maturi della famiglia miR-15, in embrioni iniettati con 50ng di Morpholino contro β -catenina e raccolti allo stadio di Gastrula. La ridotta attività di β -catenina porta ad un aumento dell'espressione di miR-15/16. U2 e miR-210 sono controlli di caricamento. 36 cicli di PCR.

d, l'inibizione di β -catenina aumenta l'attività di miR-15/16 endogeni (come in b).

e, RT-PCR per il trascritto primario Pri-miR-15/16c in embrioni con aumentata (200 pg di mRNA per β -catenina) o ridotta attività di β -catenina (80 ng di Morpholino contro β -catenina). La modulazione del segnale β -catenina non ha effetti sui livelli di trascrizione di Pri-miR-15/16c. ODC è un controllo di caricamento.

f, Wnt/ β -catenina regola i livelli di miR-16c anche in assenza di trascrizione zigotica. Gli embrioni sono stati microniettati come in Figura 9a e 9c, ma sono stati raccolti prima dello stadio di mid-blastula, ovvero quando la trascrizione zigotica è ancora spenta. miR-214 è un controllo di caricamento.

g, Ibridazione *in situ* per il gene dell'Organizzatore *Chordin*. In alto un embrione di controllo; al centro un embrione iniettato radialmente con β -catenina MO (50ng) in cui non *Chd* non viene più espresso (72% degli embrioni iniettati, n=43); in basso: embrioni iniettati con β -catenina MO, come sopra, hanno ricevuto successivamente una singola iniezione di anti-miR-15/16 (8 ng): l'espressione di *Chd* viene recuperata (71% di embrioni con recupero di *Chd*, n=24).

h, Modello della complementarità tra il segnale di Wnt/ β -catenina e la localizzazione di miR-15/16.

Figura 9

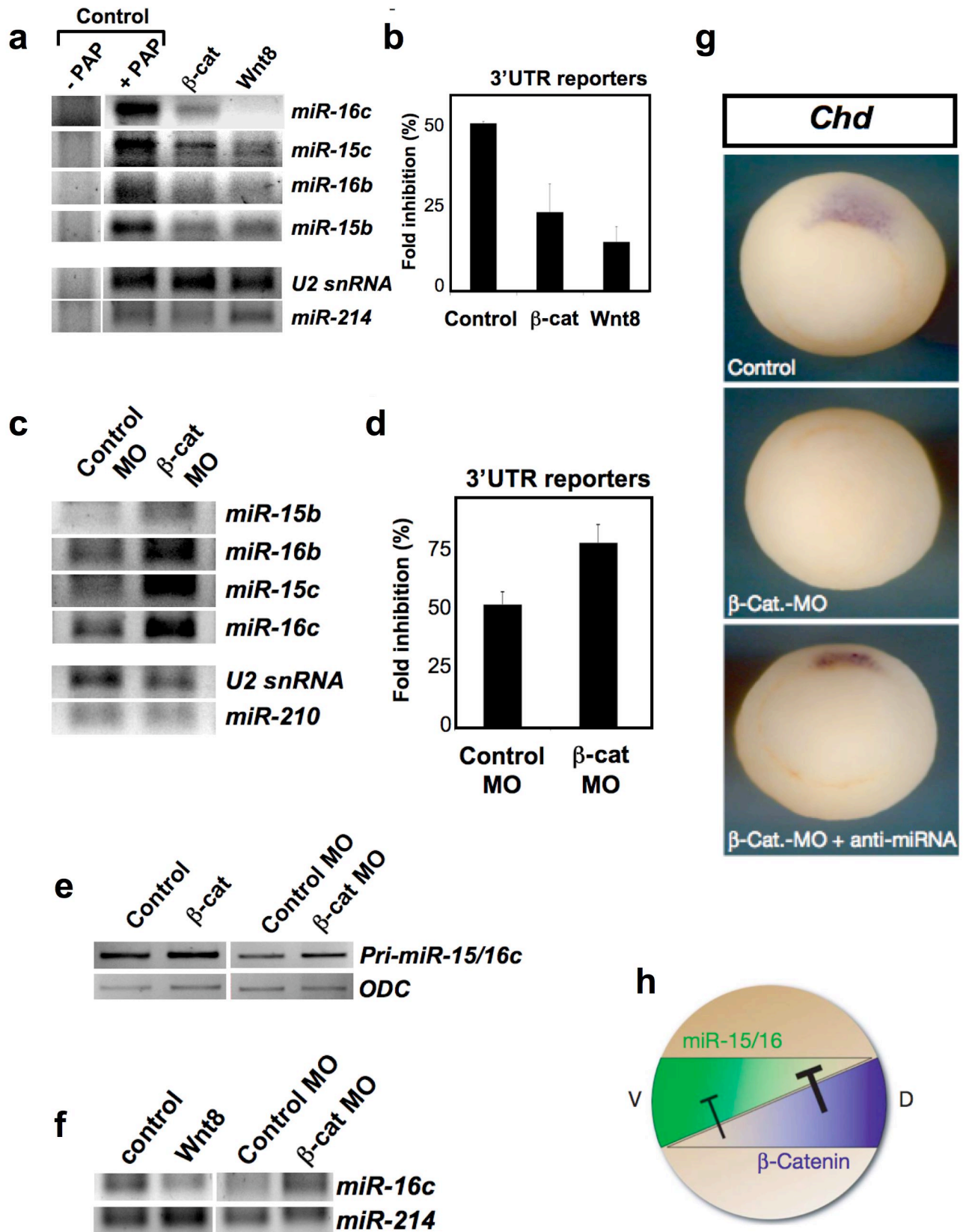


Figura 10

a, Livelli di Dicer in diversi tessuti umani derivati da analisi condotte su microarray. Questi dati non possono essere interpretati propriamente in modo quantitativo, ma dimostrano comunque un'oscillazione dei livelli di espressione di Dicer in tessuti umani. Il tessuto a cui si riferiscono i singoli livelli è indicato sotto ciascuna barra dell'isto-gramma. I valori sono stati normalizzati al valore medio di espressione dell'intero microarray. (Ge et al., 2005).

b, I livelli di espressione di Dicer in linfociti B (blu) e in linfoma di Burkitt (rosso), misurati mediante microarray, la cui distribuzione è qui mostrata in forma di Box-plot, dimostrano con una buona significatività statistica ($P\text{-Value} = 1,1 \times 10^{-7}$) una riduzione dei livelli di Dicer nel tumore rispetto al tessuto sano. I valori sono stati normalizzati al valore medio di espressione dell'intero microarray e riportati in scala logaritmica in base 2 (Basso et al., 2005).

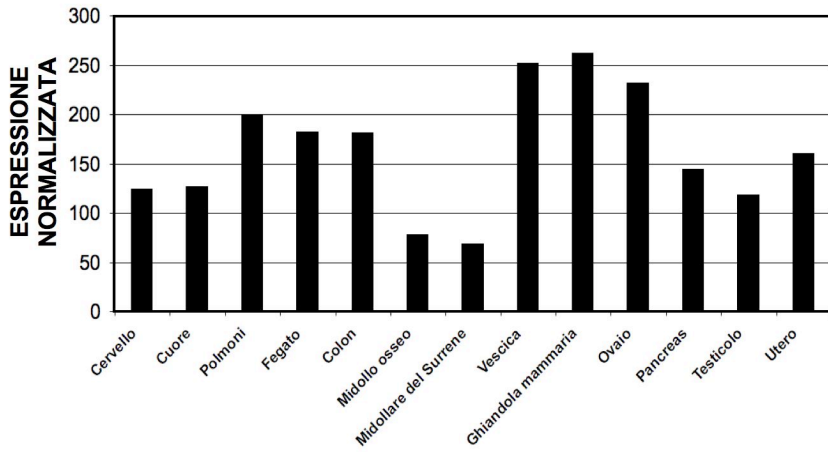
c, Rappresentazione schematica dell'mRNA di Dicer. E' riportato il 3'UTR con gli 8 siti di legame per miR-103/107 (indicati in rosso sopra il 3'UTR). Per uno dei siti di legame, viene mostrato l'allineamento delle sequenze del 3'UTR di Dicer di più specie (indicate in figura); il seed e le sequenze complementari a questo sono indicate in rosso nell'allineamento. Sono inoltre indicate le interazioni tra miR-107 maturo e il sito di legame del 3'UTR di Dicer umano.

d, Rappresentazione schematica dei costrutti "MirVec-103" e "MirVec-107". Sono schematizzati gli elementi essenziali dei costrutti: "5' LTR" e "3' LTR" (Long Terminal Repeats), necessarie alla replicazione del genoma virale ricombinante ed alla integrazione di questo nel genoma cellulare, esse inoltre definiscono le estremità dello stesso genoma virale ricombinante; " Ψ ", segnale di *packaging* necessario a far sì che il genoma ricombinante venga incluso nelle particelle virali utilizzate per la trasduzione; "CMV", promotore forte di Citomegalovirus che permette la trascrizione del gene di interesse; "Genomico miR-103/107", sequenze genomiche di circa 600 paia di basi in cui mappa il maturo di miR-103 o quello di miR-107; "Blasticidina^R", gene per la resistenza alla blasticidina, necessario alla selezione delle cellule che hanno integrato stabilmente il genoma virale ricombinante; "Ampicillina^R", gene per la resistenza all'ampicillina che permette la selezione di batteri trasformati con i costrutti "MirVec-103" e "MirVec-107", esso è utile nella fase di costruzione del vettore e non sarà incluso nelle particelle virali che andranno a trasdurre le cellule eucariotiche. (Voorhoeve et al., 2006).

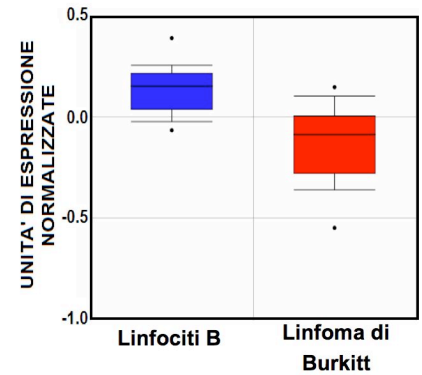
e, Quantificazione per Real-time qPCR dei livelli di miR-103 in cellule U2OS trasfettate stabilmente con MirVec-103 e con MirVec-154: i valori corrispondono alla medie di tre repliche per campione (è riportata la deviazione standard) e sono rapportati al valore medio del campione MirVec-154. Come normalizzante è stato utilizzato snRNAU6. Le cellule trasfettate con miR-103 mostrano un'espressione aumentata di 9 volte rispetto ai livelli basali.

Figura 10

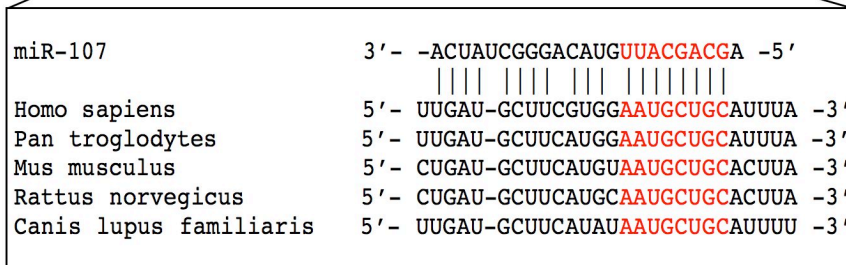
a



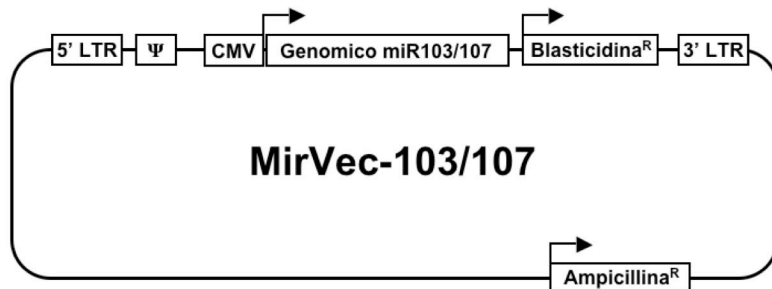
b



c



d



e

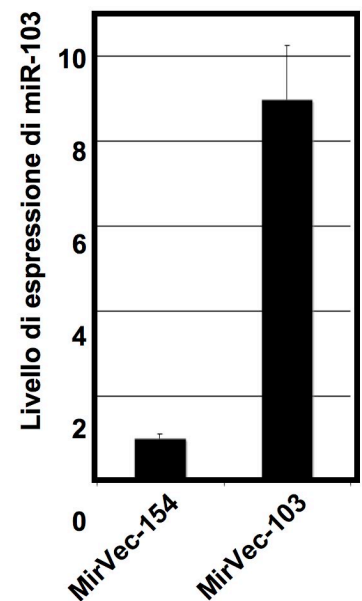


Figura 11

a, Schema del sensore “Dicer 3’UTR Lux” (in alto) e costrutto di controllo “Control Lux” (in basso). La sequenza codificante la luciferasi (“Firefly Luciferase ORF”) è posta sotto il controllo del promotore forte di Citomegalovirus (“CMV”).

Nel sensore “Dicer 3’UTR Lux” la sequenza codificante è seguita dal 3’UTR di Dicer: confrontando l’attività dei due sensori sarà possibile evidenziare eventuali regolazioni a carico di questa sequenza. In entrambi i costrutti è presente un segnale di poliadenilazione (“SV40 PA”).

b, Saggio di luciferasi in cellule stabilmente infettate. Le linee cellulari “U2OS-miR-103”, “U2OS-miR-107”, “U2OS-miR-154” e “U2OS-shGFP” sono state trasfettate con i sensori sopra descritti, ed è stato eseguito un saggio di luciferasi. I valori mostrati sono espressi come unità arbitrarie di attività di luciferasi; ogni valore rappresenta la media di tre repliche indipendenti (è riportata la deviazione standard).

L’attività di “Control Lux” non varia in maniera significativa nelle diverse linee cellulari. Al contrario, l’attività del sensore “Dicer 3’UTR Lux” è ridotta drasticamente in tutte le linee cellulari, suggerendo l’esistenza di una regolazione a carico del 3’UTR di Dicer. Questa riduzione è imputabile ai livelli endogeni di regolatori che agiscono sul 3’UTR di Dicer. Vi è infine un’ulteriore riduzione dell’attività del sensore “Dicer 3’UTR Lux” nelle linee sovraesprimenti miR-103 e miR-107, rispetto a quelle sovraesprimenti sh-GFP e miR-154; questa è da imputarsi invece ad un ruolo strumentale dei miRNA della famiglia miR-103 nella regolazione attraverso il 3’UTR di Dicer.

c, Analisi dell’espressione di Dicer per western-blot in linee cellulari con espressione stabile di miR-103 e di miR-107. I risultati si riferiscono a linee cellulari (U2OS, MCF10A ed MDA-231) esprimenti stabilmente miR-103, miR-107 o i controlli shGFP e miR-154. Beta-Catenina (β -cat) è stata utilizzata come controllo di caricamento. Si evidenzia per tutte le linee cellulari una riduzione dei livelli della proteina Dicer nelle cellule overesprimenti miR-103 e miR-107 rispetto ai controlli.

d, Analisi dell’espressione di Dicer per western-blot in linee cellulari trasfettate transientemente con miR-107 maturo. I risultati si riferiscono a linee cellulari (HCT-116, HepG2, B9 ed MDA-231) trasfettate transientemente con miR-107, con un siRNA di controllo (“Control”) o con un ulteriore controllo di specificità: “miR-107 MUT”, che presenta 3 mutazioni nella regione del seed. Lamina B (“LaminB”) è stata utilizzata come controllo di caricamento. Si evidenzia per tutte le linee cellulari una riduzione dei livelli della proteina Dicer nelle cellule trasfettate con miR-107 maturo rispetto ai controlli.

Figura 11

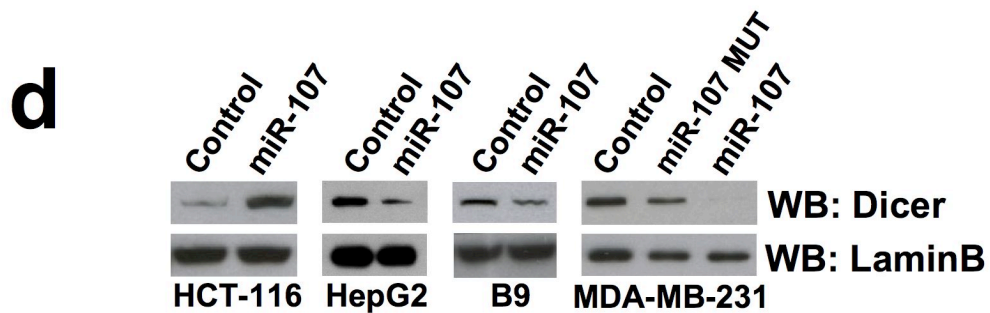
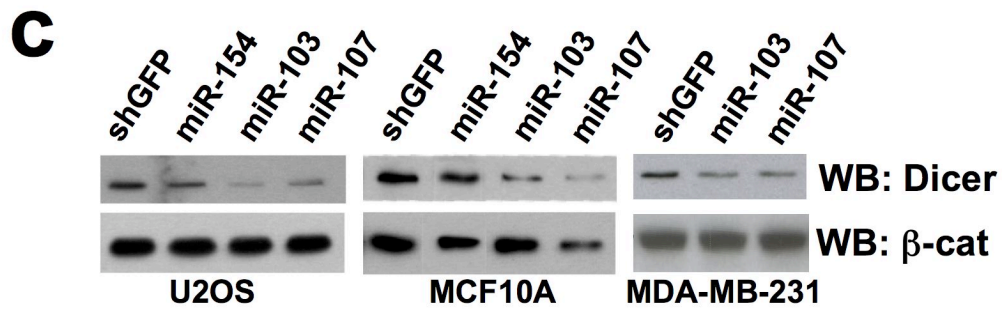
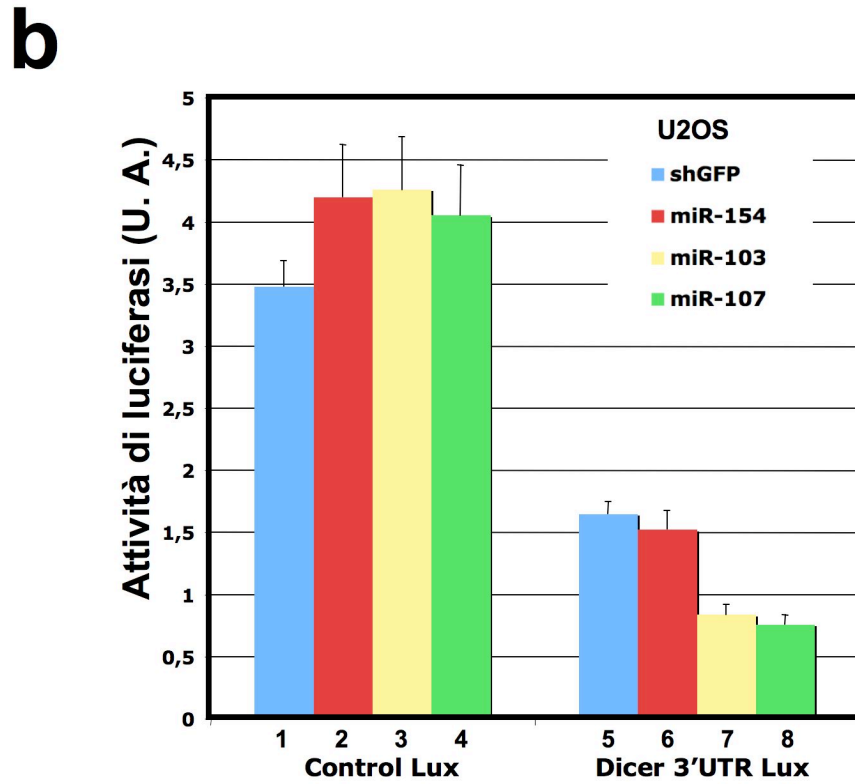
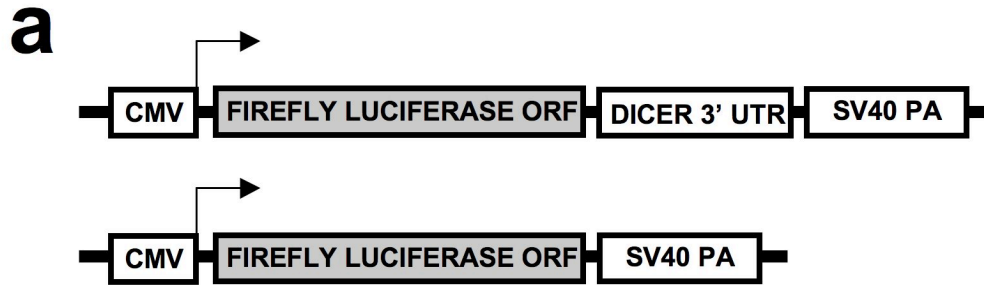


Figura 12

a, Morfologia di cellule HepG2 trasfettate transientemente con un siRNA di controllo (“HepG2 Control”). Le cellule di controllo mostrano la morfologia caratteristica delle HepG2, formano epiteli compatti.

b, Morfologia di cellule HepG2 trasfettate transientemente con il maturo di miR-107 (“HepG2 miR-107”). Le cellule trasfettate con miR-107 presentano una ridotta adesività intercellulare e lunghe protrusioni citoplasmatiche (filopodi e lamellipodi).

c, Analisi dei livelli proteici di E-Caderina mediante western-blot. E-Caderina è una proteina di adesione intercellulare tipicamente espressa dalle cellule epiteliali. I livelli di E-Caderina sono ridotti nelle cellule trasfettate con miR-107 rispetto ai controlli. LaminB è stata utilizzata come controllo di caricamento.

d, Analisi dei livelli proteici di Dicer in cellule MDA-MB-231 mediante western-blot. Le cellule MDA-MB-231 sono state trasfettate con l’siRNA di controllo (“Control”), con miR-107 maturo (“miR-107”), con siRNA contro Dicer ad una concentrazione di 100 pmol/cm² (“siDicer high”) o con siRNA contro Dicer ad una concentrazione di 10 pmol/cm² (“siDicer low”).

I livelli di Dicer sono ridotti nelle cellule trasfettate con miR-107; “siDicer high” riduce molto più di miR-107 i livelli di Dicer, mentre “siDicer low” porta ad una riduzione di Dicer quantitativamente simile a quella ottenibile con “miR-107”. Come controllo di caricamento è stato utilizzata beta-catenina (“β-cat”).

e, Scratch assay per cellule MDA-MB-231 trasfettate con siRNA di controllo (“MDA-MB-231 Control”). Dopo la trasfezione con il reagente le cellule sono state lasciate in coltura fino a completa confluenza ed è poi stato fatto un “graffio” (evidenziato dalle linee bianche tratteggiate). Dopo 12 ore le cellule sono state fissate e fotografate. In questo caso il “graffio” rimane aperto.

f, Scratch assay per cellule MDA-MB-231 trasfettate con il maturo di miR-107 (“MDA-MB-231 miR-107”). Dopo la trasfezione con il reagente le cellule sono state lasciate in coltura fino a completa confluenza ed è poi stato fatto un “graffio” (evidenziato dalle linee bianche tratteggiate). Dopo 12 ore le cellule sono state fissate e fotografate. In questo caso il “graffio” risulta del tutto chiuso (si compari con Figura 12e).

g, Scratch assay per cellule MDA-MB-231 trasfettate con l’siRNA contro Dicer a concentrazione di 10 pmol/cm² (“MDA-MB-231 siDicer”). Dopo la trasfezione con il reagente le cellule sono state lasciate in coltura fino a completa confluenza ed è poi stato fatto un “graffio” (evidenziato dalle linee bianche tratteggiate). Dopo 12 ore le cellule sono state fissate e fotografate. In questo caso il “graffio” risulta parzialmente chiuso (si compari con Figura 12e); si può osservare un effetto simile a quello di figura 12f.

h, Quantificazione degli scratch assays delle figure 12e, 12f e 12g: per ogni campione sono state contate le cellule migrate in almeno 6 campi. L’istogramma presenta il numero medio di cellule all’interno della regione del “graffio” per campo e la deviazione standard per i diversi scratch assays.

Figura 12

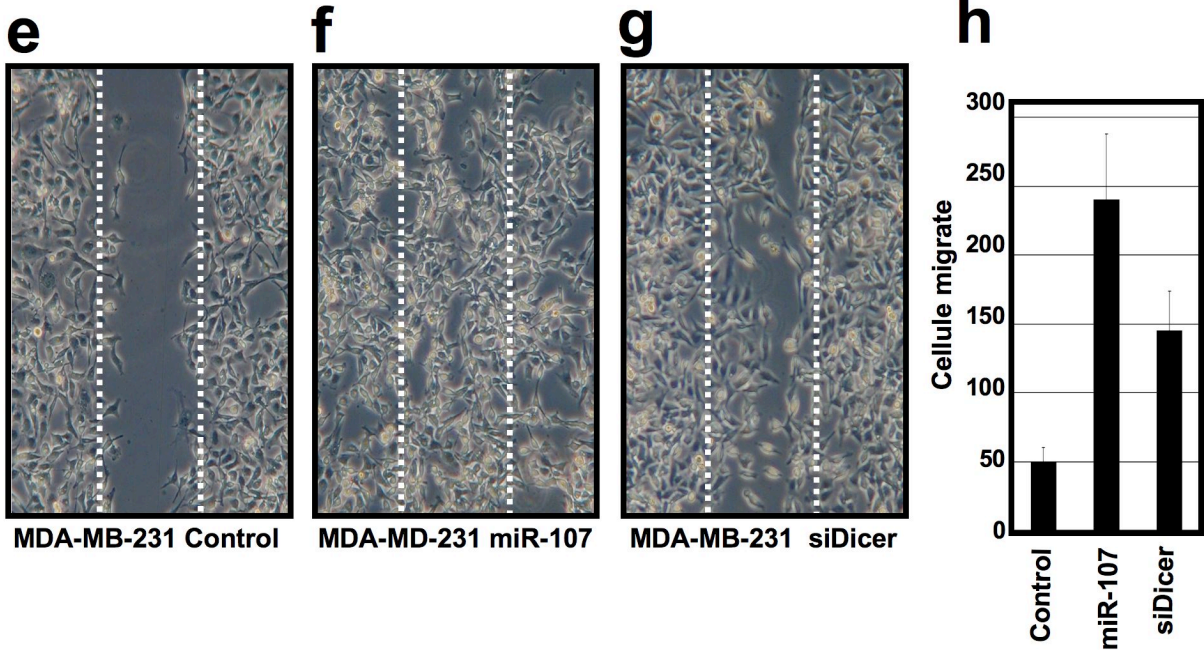
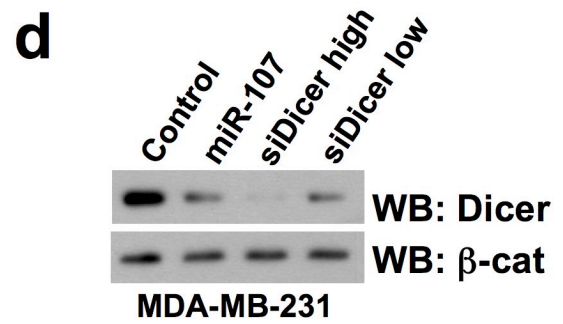
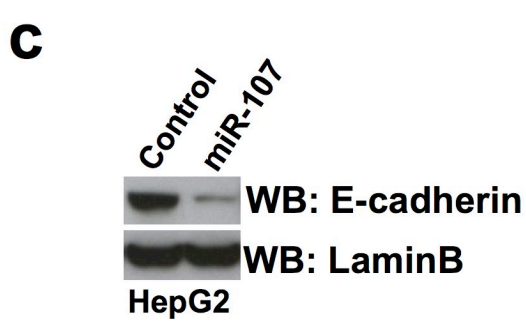
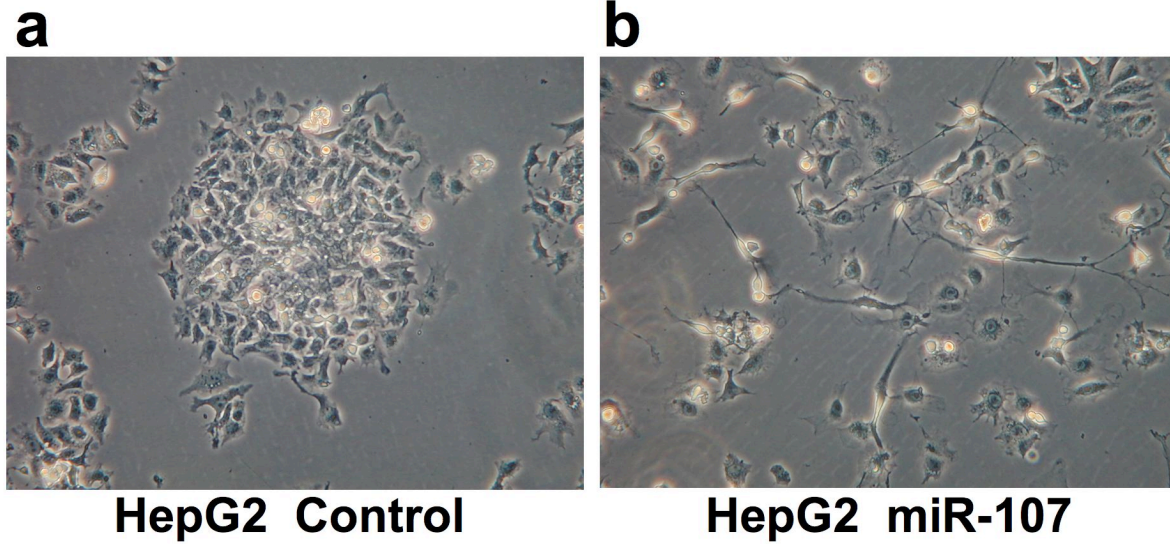


Figura 13

a, Gli istogrammi mostrano i livelli di espressione (misurati attraverso microarray) per E-Caderina, Recettore degli Estrogeni, Vimentina e Dicer, nelle seguenti linee cellulari di tumore della mammella (indicate andando da sinistra verso destra):

“Luminali”: 600MPE (1), LY2 (2), MCF7 (3), SUM-44PE (4), SUM-52PE (5), T47D (6), BT-474 (7), ZR-7530 (8).

“Mesenchimali”: BT-549 (1), HBL-100 (2), HS-578T (3), MDA-MB-157 (4), MDA-MB-231 (5), MDA-MB-435 (6), MDA-MB-436 (7), SUM-159PT (8), SUM-1315 (9).

I valori sono stati normalizzati al valore medio di espressione dell'intero microarray e sono riportati in scala logaritmica in base 2. (Neve et al., 2006).

b, Box-plot rappresentativi della distribuzione di livelli di espressione di Dicer (misurati attraverso microarray) in tumori della mammella espianati da pazienti.

I valori di espressione sono stati normalizzati al valore medio di espressione dell'intero microarray e riportati in scala logaritmica in base 2.

In base alle caratteristiche emerse dall'analisi istologica, ogni tumore è stato classificato sulla base dello standard “Nottingham Grade”: tumori con caratteristiche ben differenziate sono definiti di “grado 1” (G1, box-plot blu in figura), i tumori scarsamente differenziati sono definiti di “grado 3” (G3, box-plots verdi in figura) ed i tumori con caratteristiche di differenziamento intermedie sono definiti di “grado 2” (G2, box-plots rossi in figura).

La significatività statistica della differenza nei livelli di Dicer tra tumori di “Grado 1” e tumori di “Grado 3” è riportata sotto ogni grafico (P-Value).

Gli autori da cui questi risultati sono tratti sono riportati sopra ogni grafico (da sinistra a destra): Bittner, 2005; Gingester et al., 2006; Ivshina et al., 2006; van't Veer et al., 2002 (Fonte Oncomine).

Come si può notare i valori di espressione di Dicer tendono a diminuire all'aumentare del “grado” di classificazione del tumore, ossia andando verso tumori che mostrano caratteri di differenziamento sempre meno marcati e che presentano un fenotipo sempre più aggressivo.

c, Distribuzione di frequenza dei valori di espressione di Dicer in tumori primari della mammella espianati da 293 pazienti (dal database del Netherlands Cancer Institute; van de Vijver et al., 2002). I livelli di Dicer sono stati misurati attraverso l'utilizzo di microarray. La distribuzione mostra due picchi in corrispondenza dei valori di espressione 0,07 e -0,02; questo è indicativo della presenza di due popolazioni con caratteristiche differenti.

Il valore soglia da noi scelto per classificare i pazienti come appartenenti alla classe ad alta espressione di Dicer (“high”) o alla classe a bassa espressione di Dicer (“low”) è indicato sulla distribuzione con una linea rossa tratteggiata; il valore soglia è pari a 0,02.

d, Curve Kaplan-Meier indicative della sopravvivenza in assenza di metastasi per pazienti dopo espianato di tumore primario della mammella.

Il database del Netherlands Cancer Institute associa ai dati di espressione del tumore di ogni paziente anche dati clinici, tra cui l'eventuale insorgenza di metastasi dopo l'espianato della massa tumorale primaria.

I pazienti del database (n = 293) sono stati suddivisi nelle due classi Dicer “high” e Dicer “low”, in accordo con quanto descritto in Figura 13c.

I pazienti con livelli di Dicer più elevati nel tumore primario mostrano una aumentata probabilità di sopravvivenza in assenza di metastasi. Al contrario, pazienti con livelli ridotti di Dicer hanno una maggiore probabilità di sviluppare metastasi. La significatività statistica è stata calcolata con Log-Rank Test: P-Value (P) = 2×10^{-3} .

Figura 13

