



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI ISTOLOGIA, MICROBIOLOGIA E
BIOTECNOLOGIE MEDICHE

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOMEDICINA

CICLO: XXIV

**Studio del ruolo di mutazioni missenso di *CDC73* e microRNA
in tumori *CDC73*-correlati familiari e sporadici**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Giorgio Palù

Supervisore : Ch.ma Prof.ssa Luisa Barzon

Dottoranda : Dr.ssa Giulia Masi

INDICE

RIASSUNTO	pag. 1
ABSTRACT	pag. 3
CAPITOLO 1	
INTRODUZIONE	pag. 5
1. La sindrome da iperparatiroidismo con tumori mandibolari (HPT-JT) e il gene <i>HRPT2 (CDC73)</i>	pag. 5
1.1 Caratteristiche principali della sindrome da iperparatiroidismo con tumori mandibolari	pag. 5
1.2 Il gene mutato nella sindrome HPT-JT: <i>HRPT2 (CDC73)</i>	pag. 6
1.3 Funzioni di parafibromina	pag. 8
<i>1.3.1. Parafibromina nel complesso Paf1</i>	pag. 8
<i>1.3.2. Repressione dell'espressione di ciclina D1</i>	pag. 8
<i>1.3.3. Repressione dell'espressione di c-Myc</i>	pag. 9
<i>1.3.4. Parafibromina sembra intervenire nel controllo della traduzione proteica</i>	pag. 9
<i>1.3.5. Parafibromina nella pathway di Wnt</i>	pag. 9
<i>1.3.6. Interazione di parafibromina con il Large T antigen di SV40</i>	pag. 10
<i>1.3.7. Parafibromina nella pathway di Hedgehog</i>	pag. 10
<i>1.3.8. Ruolo di parafibromina nel citoplasma</i>	pag. 11
<i>1.3.9. Funzione di parafibromina nello sviluppo embrionale</i>	pag. 11
1.4 Mutazioni di <i>CDC73</i>	pag. 11
1.5 Effetti funzionali delle mutazioni di <i>CDC73</i>	pag. 12
2. Tumori paratiroidei sporadici	pag. 14
2.1 Ruolo di <i>CDC73</i> nella patogenesi dei tumori paratiroidei sporadici	pag. 14
2.2 Altri potenziali marcatori immunostochimici di malignità per i tumori paratiroidei sporadici	pag. 15

2.2.1. PGP9.5	pag. 15
2.2.2. APC	pag. 16
2.3 I microRNA	pag. 16
2.3.1. Cenni su funzione e biogenesi dei microRNA	pag. 16
2.3.2. I miRNA nei tumori	pag. 18
2.3.3. MiRNA profiling nei tumori: applicazioni cliniche	pag. 19
2.3.4. I miRNA nei tumori paratiroidei	pag. 21
CAPITOLO 2	
SCOPO DELLO STUDIO	pag. 25
CAPITOLO 3	
MATERIALI E METODI	pag. 27
3.1 Studio del ruolo di <i>CDC73</i> nella patogenesi del fibroma ossificante mandibolare nella sindrome HPT-JT	pag. 27
3.1.1. Paziente HPT-JT	pag. 27
3.1.2. Estrazione di DNA da tessuto congelato, amplificazione e sequenziamento di <i>CDC73</i>	pag. 28
3.1.3. Separazione degli alleli	pag. 29
3.1.4. Linea cellulare e plasmidi di espressione impiegati	pag. 31
3.1.5. Mutagenesi sito-specifica	pag. 31
3.1.6. Amplificazione e sequenziamento dell'inserto	pag. 33
3.1.7. Maxipreparazione di DNA plasmidico	pag. 33
3.1.8. Immunofluorescenza e microscopia confocale	pag. 33
3.1.9. Western Blot	pag. 34
3.1.10. Saggio di proliferazione cellulare	pag. 36
3.1.11. Studio del ciclo cellulare tramite citofluorimetria a flusso	pag. 36
3.1.12. Studio dell'induzione di apoptosi tramite citofluorimetria a flusso	pag. 37
3.2 Studio del profilo di espressione di miRNA in tumori paratiroidei sporadici con miRNA-microarrays	pag. 37

<i>3.2.1. Tumori paratiroidei sporadici analizzati</i>	pag. 37
<i>3.2.2. Estrazione di RNA da tessuto congelato ed analisi dell' espressione di miRNA con miRNA- microarrays</i>	pag. 38
<i>3.2.3. Pre-processing dei dati e Significance Analysis of Microarrays (SAM)</i>	pag. 38
<i>3.2.4. Gene set enrichment analysis (GSEA)</i>	pag. 40
<i>3.2.5. Criteri di selezione di miR-9 per studi in vitro</i>	pag. 42
<i>3.2.6. Real Time-RT PCR per miR-9</i>	pag. 42
<i>3.2.7. Clonaggio e produzione del plasmide pmirGLO-CDC73</i>	pag.42
<i>3.2.8. Saggio dell'attività luciferasica per la valutazione dell'attività di miR-9</i>	pag. 43
<i>3.2.9. Analisi dell'espressione di parafibromina e ciclina D1 tramite western blot</i>	pag. 44
<i>3.2.10. Immunoistochimica per parafibromina e ciclina D1 su sezioni di tumori paratiroidei sporadici</i>	pag. 44

CAPITOLO 4

RISULTATI

4.1. Studio funzionale di una nuova mutazione missenso nella regione N-terminale di parafibromina	pag. 47
<i>4.1.1. Identificazione di una mutazione di singolo nucleotide nel gene CDC73 in un fibroma ossificante mandibolare</i>	pag. 47
<i>4.1.2. Predizione della potenziale patogenicità della mutazione Ile60Asn di CDC73</i>	pag. 47
<i>4.1.3. La mutazione Ile60Asn può rappresentare il "secondo hit" di CDC73 in un tumore mandibolare associato a HPT-JT</i>	pag. 49
<i>4.1.4. Parafibromina mutata Ile60Asn è priva di localizzazione nucleolare e risulta meno espressa della wild-type</i>	pag. 49
<i>4.1.5. Ridotta espressione di parafibromina mutata Ile60Asn</i>	pag. 51
<i>4.1.6. Parafibromina mutata Ile60Asn non è in grado di ridurre l'espressione di ciclina D1</i>	pag. 51
<i>4.1.7. La valutazione della proliferazione cellulare tramite BrdU-assay non rileva differenze significative tra cellule trasfettate</i>	pag. 52
<i>4.1.8. La valutazione del ciclo cellulare con citofluorimetria a flusso evidenzia un effetto del mutante Ile60Asn nella progressione nel ciclo</i>	

<i>cellulare</i>	pag. 53
4.1.9. Il mutante <i>Ile60asn</i> non induce variazioni nell'apoptosi basale di cellule <i>HEK293A</i>	pag. 54
4.2. Analisi dei miRNA nei tumori paratiroidi e del loro ruolo nella regolazione dell'espressione di parafibromina	pag. 56
4.2.1. Analisi dei dati di espressione di miRNA in adenomi e carcinomi paratiroidi: preprocessing e Significance Analysis of Microarrays (SAM)	pag. 56
4.2.2. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)	pag. 56
4.2.3. Selezione di miR-9, evidenziato dalla GSEA, per validazione di parafibromina come target	pag. 57
4.2.4. Saggio dell'attività luciferasica in cellule <i>HEK293A</i> co-trasfettate con l'UTR 3' di <i>CDC73</i> e miR-9	pag. 58
4.2.5. Effetto della trasfezione di miR-9 sull'espressione di parafibromina in cellule <i>HEK293A</i>	pag. 59
4.2.6. Effetto della trasfezione di miR9 sull'espressione di ciclina <i>D1</i> in cellule <i>HEK293A</i>	pag. 59
4.2.7. Immunoistochimica per parafibromina e ciclina e correlazione con l'espressione di miR-9 secondo real time-RT-PCR	pag. 60
CAPITOLO 5	
DISCUSSIONE	pag. 63
5.1. Identificazione e caratterizzazione di una mutazione missenso di <i>CDC73</i>	pag. 63
5.2. MiRNA- <i>profiling</i> nei tumori paratiroidi sporadici e validazione di parafibromina come target di miR-9	pag. 70
CAPITOLO 6	
APPENDICE	pag. 77
A. Principali caratteristiche delle mutazioni missenso di <i>CDC73</i> note	pag. 77
B. MiRNA collegati alla pathway di PKC	pag. 78
C. MiRNA collegati alla pathway di PTEN	pag. 78
D. MiRNA collegati alla pathway di SHH	pag. 80

CAPITOLO 7

BIBLIOGRAFIA

pag. 81

RINGRAZIAMENTI

pag. 91

RIASSUNTO

Mutazioni del gene oncosoppressore *CDC73*, codificante per parafibromina, sono associate alla sindrome da iperparatiroidismo-tumori mandibolari (HPT-JT): tale sindrome, a trasmissione autosomica dominante, è caratterizzata principalmente dall'insorgenza di tumori paratiroidi e, meno frequentemente, di fibromi ossificanti mandibolari e di vari tipi di anomalie uterine e renali, sia benigne che maligne.

In letteratura non esistono dati riguardo allo stato mutazionale di *CDC73* nei fibromi ossificanti mandibolari dei pazienti HPT-JT.

Nel presente studio, è stata identificata una nuova mutazione somatica missenso di *CDC73*, Ile60Asn, nel tumore mandibolare di una paziente di una famiglia HPT-JT portatrice di una mutazione germinale frameshift di *CDC73*. Le mutazioni missenso di *CDC73* sono molto rare, e spesso interessano residui nella porzione N-terminale di parafibromina, la cui funzione non è ancora nota.

Secondo una predizione *in silico*, la sostituzione Ile60Asn è verosimilmente patogenetica, e altera un amminoacido altamente conservato. Per studiare *in vitro* il potenziale tumorigenico della mutazione, sono stati effettuati esperimenti nella linea cellulare HEK293A per analizzare possibili effetti su localizzazione subcellulare e livello di espressione della proteina mutata, proliferazione cellulare, apoptosi ed espressione di ciclina D1 e c-Myc. È stato osservato che il mutante Ile60Asn era meno espresso della sua controparte *wild-type*, era privo di localizzazione nucleolare e mostrava ridotta capacità di inibizione dell'espressione di ciclina D1; inoltre, la frazione cellulare nelle fasi G2-M risultava aumentata nelle cellule trasfettate con parafibromina mutata. Non sono stati osservati effetti sull'espressione di c-Myc e sull'induzione di apoptosi.

In conclusione, la mutazione Ile60Asn sembrava agire secondo un meccanismo di dominanza negativa, e non dare origine solamente ad una forma inattiva di parafibromina. La localizzazione nucleolare di parafibromina è verosimilmente cruciale per permettere alla proteina di esercitare le sue funzioni antiproliferative. Questi risultati indicano che i fibromi ossificanti mandibolari che insorgono in pazienti con HPT-JT non rappresentano effetti secondari dell'iperparatiroidismo, ma si presentano in seguito ad un secondo evento mutazionale a carico di *CDC73*.

Le mutazioni di *CDC73* non sono responsabili solamente dell'insorgenza di forme familiari di iperparatiroidismo primitivo: mutazioni inattivanti di questo gene, infatti, vengono identificate nel 77% circa dei tumori paratiroidi sporadici maligni. Un'elevata percentuale di carcinomi sporadici con anomalie a carico di *CDC73* mostra una forte perdita di immunoreattività per parafibromina. Al contrario, negli adenomi paratiroidi sporadici, *CDC73* non sembra avere un ruolo patogenetico di primo piano, dato che risulta mutato molto raramente (0-4%) nei tumori benigni.

Tuttavia, secondo nostre precedenti esperienze, l'immunoreattività per parafibromina mostra elevata variabilità, senza differenze significative tra tumori paratiroidi sporadici benigni e maligni. Inoltre, sono stati osservati alcuni casi di adenoma paratiroideo sporadico privi di mutazioni di *CDC73*, ma con basso livello di espressione di parafibromina. E' quindi possibile ipotizzare l'esistenza di meccanismi, differenti dalla mutazione di *CDC73*, che possano causare una diminuzione dell'espressione di parafibromina: tra questi, una *down-regolazione* ad opera di microRNA (miRNA). Attualmente, in letteratura sono presenti solamente due studi sul profilo di espressione di miRNA nei tumori paratiroidi sporadici. Nel presente studio, è stato attuato un approccio di *profiling* con miRNA-microarrays in 8 adenomi e 3 carcinomi paratiroidi sporadici, per identificare miRNA differenzialmente espressi tra le due condizioni. L'analisi SAM non ha evidenziato miRNA significativamente differenti tra tumori benigni e maligni, mentre la *Gene Set Enrichment Analysis* su miRNA associati a determinate *pathways* cellulari ha identificato un arricchimento nei miRNA collegati alle *pathways* di PKC e PTEN negli adenomi, ed alla *pathway* di SHH nei carcinomi.

E' stato scelto per ulteriori approfondimenti sperimentali miR-9, collegato ad entrambe le vie PKC e PTEN, che ha fra i suoi target predetti in silico *CDC73*. Il saggio dell'attività luciferasica e il *western blot* in cellule HEK293A hanno dimostrato che miR-9 era in grado di diminuire l'espressione di parafibromina. Inoltre, era presente un effetto indiretto sull'espressione di ciclina D1, più espressa in cellule trasfettate con miR-9.

In sezioni incluse in paraffina dei tessuti tumorali impiegati per l'analisi con miRNA-microarrays, non sono state osservate correlazioni tra il livello di miR-9 e l'immunoreattività per parafibromina e ciclina D1.

In conclusione, nei tumori paratiroidi sporadici non è stata evidenziata la presenza di miRNA differenzialmente espressi tra adenomi e carcinomi. MiR-9 ha *CDC73* come target in vitro, ma in vivo non sembra essere responsabile delle differenze di immunoreattività per parafibromina e ciclina D1.

ABSTRACT

Mutations of the *CDC73* oncosuppressor gene, encoding for parafibromin, are associated with the HPT-JT syndrome, an autosomic dominant syndrome whose clinical manifestations are mainly parathyroid tumors and, less frequently, ossifying fibromas of the jaws and various types of benign or malignant uterine and renal anomalies.

There are no data in the literature about *CDC73* mutational status in ossifying jaw tumors from HPT-JT patients.

In the present study, we identified a novel *CDC73* missense substitution, Ile60Asn, in the mandibular tumor of a patient from a well-characterized HPT-JT kindred with a germline *frameshift* mutation in the *CDC73* gene. Missense mutations of the *CDC73* oncosuppressor gene are very rare and often involve residues at the N-terminal of parafibromin, whose structure and function are to date unknown.

According to an *in silico* prediction, the Ile60Asn substitution was predicted to be pathogenetic and involved a conserved amino acid. In order to analyze *in vitro* the tumorigenic potential of this mutation, we performed transfection experiments in HEK293A cells to assess effects on subcellular localization, mutant protein amount, cell proliferation, apoptosis, and cyclin D1 and c-Myc expression. We demonstrated that the Ile60Asn mutant was less expressed than the *wild-type* protein, lacked nucleolar localization, was less able to decrease cyclin D1 expression, and increased the percentage of cells in the G2-M phases of cellular cycle. No effects were observed on c-Myc expression and on induction of spontaneous apoptosis.

In conclusion, the Ile60Asn mutation exhibited dominant interfering properties and not only determined production of an inactive parafibromin. The nucleolar localization of parafibromin is likely crucial to fully elicit the antiproliferative effects of parafibromin.

These results indicate that ossifying fibromas of the jaw arising in patients with HPT-JT syndrome are not secondary effects of hyperparathyroidism, but occur for a second distinct mutational event in the *CDC73* gene.

CDC73 mutations are involved not only in familial forms of primary hyperparathyroidism; inactivating *CDC73* mutations are found in 77% of sporadic malignant parathyroid tumors. A high percentage of sporadic carcinomas with *CDC73*

genetic anomalies shows a strong loss of immunoreactivity for parafibromin. By converse, in sporadic parathyroid adenomas, *CDC73* seems not to have a clear pathogenetic role: alterations in this gene are very rare (0-4%) in benign tumors.

Nevertheless, in previous observations of our research group, parafibromin immunoreactivity showed great variability, with no significant difference between benign and malignant sporadic parathyroid tumors. In addition, some cases of sporadic parathyroid adenomas without *CDC73* mutations with low parafibromin expression were observed. We can hypothesize the presence of mechanisms different from *CDC73* mutations that might result in decrease of parafibromin expression, like down-regulation by microRNAs (miRNAs). To date, in the literature there are only two studies on miRNAs expression profile in sporadic parathyroid tumors. We performed miRNA-*profiling* with miRNA-microarrays on 8 sporadic parathyroid adenomas and 3 sporadic parathyroid carcinomas, in order to identify differentially expressed miRNAs. A SAM approach failed to demonstrate significantly different miRNAs in sporadic adenomas vs. carcinomas, while Gene Set Enrichment Analysis on cell pathways-associated miRNAs found an enrichment for miRNAs linked to PKC and PTEN pathway in adenomas and for miRNAs linked to SHH pathway in carcinomas.

We selected for further analysis miR-9, acting in both PKC and PTEN pathways, and predicted *in silico* to target *CDC73*. Luciferase assay and western blot in HEK293A cells showed that miR-9 is able to downregulate parafibromin expression. In addition, there was an indirect effect on cyclin D1 expression, that was upregulated in cells transfected with miR-9.

In paraffin-embedded sections of the tumor tissues employed for miRNA-microarray analysis, there were no correlations between miR-9 level in real-time RT PCR and parafibromin or cyclin D1 immunoreactivity.

In conclusion, in sporadic parathyroid tumors we failed to demonstrate miRNAs differentially expressed between benign and malignant neoplasms. MiR-9 targets *CDC73 in vitro*, but *in vivo* it seems not to account for differences in parafibromin and cyclin D1 immunoreactivity.

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1. La sindrome da iperparatiroidismo con tumori mandibolari (HPT-JT) e il gene *HRPT2* (*CDC73*)

1.1. Caratteristiche principali della sindrome da iperparatiroidismo con tumori mandibolari

La sindrome da iperparatiroidismo-tumori mandibolari HPT-JT è stata riconosciuta come un'entità clinica a sé stante in epoca relativamente recente (*Jackson et al., 1990*). Si tratta di una sindrome a trasmissione autosomica dominante, la cui principale caratteristica è data dall'insorgenza di iperparatiroidismo, dovuto a tumori delle ghiandole paratiroidi; l'iperparatiroidismo si sviluppa nel 90% circa dei pazienti ed è generalmente la prima manifestazione clinica della patologia. Una peculiarità di questa condizione è l'elevata percentuale di affetti che sviluppano un tumore paratiroideo maligno: infatti, il 15% circa dei pazienti risulta affetto da carcinomi paratiroidi (*Cavaco et al., 2001; Teh et al., 1998; Wassif et al., 1999; Hobbs et al., 1999; Haven et al., 2000*), in contrasto con altre forme di iperparatiroidismo primitivo familiare, in cui il coinvolgimento paratiroideo è prevalentemente benigno.

Il 30% circa degli affetti può sviluppare anche fibromi ossificanti mandibolari e mascellari, che hanno caratteristiche differenti rispetto ai cosiddetti "tumori bruni" che si associano a volte a casi di iperparatiroidismo severo e che non regrediscono dopo la resezione del tumore paratiroideo (*Jackson et al., 1990*).

Negli affetti da HPT-JT, possono presentarsi anche lesioni renali di vari tipi, sia benigne che maligne, come cisti bilaterali, amartomi, tumori di Wilms o carcinomi renali a cellule chiare (*Jackson et al., 1990; Szabo et al., 1995; Haven et al., 2000*). Nel 2005, inoltre, Bradley e colleghi (*Bradley et al., 2005*) studiano estensivamente, dal punto di vista genetico e clinico, 33 famiglie con forme ereditarie di iperparatiroidismo primitivo e identificano nelle donne affette da HPT-JT un'elevata percentuale di anomalie e

tumori uterini (adenosarcomi, adenofibromi, leiomiomi, adenomiosi, iperplasia endometriale). Le donne affette, nelle famiglie studiate, risultano nel complesso avere un significativo deficit riproduttivo rispetto alle loro parenti non affette.

Infine, occasionalmente, si osservano in pazienti con HPT-JT altre tipologie di tumori, come l'adenoma tiroideo a cellule di Hurtle, l'adenocarcinoma pancreatico e tumori germinali del testicolo (*Haven et al., 2000*).

1.2. Il gene mutato nella sindrome HPT-JT: *HRPT2* (*CDC73*)

Il gene le cui mutazioni sono responsabili dello sviluppo della sindrome HPT-JT viene identificato nel 2002 (*Carpten et al., 2002*). In precedenza, analisi di linkage avevano identificato un locus associato a HPT-JT (denominato *HRPT2*) in una regione di circa 15cM in posizione 1q24-q32 (*Szabo et al., 1995; Teh et al., 1996; Hobbs et al., 2002*). Usando un approccio di “*positional cloning*” in uno studio su 26 famiglie affette da HPT-JT o FIHP, Carpten e colleghi identificano un gene, inizialmente denominato *HRPT2* (Fig. 1.1). Il gene identificato risulta essere composto da 1596 nucleotidi, e suddiviso in 17 esoni codificanti per una proteina di 531 aminoacidi, del peso molecolare di circa 60 kDa (*Carpten et al., 2002*). In 14 dei 26 probandi studiati, vengono identificate 13 diverse mutazioni germinali in eterozigosi in *HRPT2*. Tutte le mutazioni identificate sono inattivanti, dal momento che risultano in slittamento del codice di lettura o determinano la formazione di codoni di stop prematuri. La proteina codificata da *HRPT2* risulta essere altamente conservata dal punto di vista evolutivo, e vengono identificate sequenze potenzialmente ortologhe in topo, *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans*. Gli autori dello studio propongono per la proteina prodotta da *HRPT2* il nome parafibromina, dato il suo coinvolgimento nello sviluppo di tumori paratiroidi e di fibromi ossificanti mandibolari.

Parafibromina non sembra avere omologie con domini proteici noti, ma mostra un certo grado di identità (32%) e di similarità (54%) con una proteina di *Saccharomyces cerevisiae*, Cdc73p, fattore che si associa ad una RNA polimerasi II ed è importante nell'inizio della trascrizione e nell'elongazione del trascritto nel lievito (per tale motivo, per *HRPT2* è stata in seguito proposta la denominazione ufficiale di *CDC73*, che verrà d'ora in avanti impiegata anche in questa trattazione).

Per verificare la probabile funzione di oncosoppressore di *CDC73*, il DNA normale e tumorale di individui affetti da adenoma paratiroideo viene studiato per ricercare eventuale perdita di eterozigotà (LOH) e mutazioni a carico del gene. Il 12,5% dei

tumori risulta avere LOH a livello di 1q e in, molti casi, hanno mutazioni somatiche inattivanti di *CDC73*. La presenza di LOH in 1q suggerisce che per lo sviluppo di HPT-JT sia necessaria un'inattivazione biallelica di *CDC73*; tuttavia, la frequenza di LOH in *CDC73* dimostrata nello studio è molto bassa se paragonata, ad esempio, al 70% di LOH che si riscontra nel gene *MEN1* nei tumori paratiroidi di individui affetti dalla sindrome MEN1 (neoplasie endocrine multiple di tipo I). Gli autori dello studio ipotizzano quindi che, a livello somatico, possano prevalere mutazioni poco estese di *CDC73*, come anche inattivazione funzionale o ipermetilazione del promotore, piuttosto che fenomeni di perdita di eterozigotità.

La presenza di mutazioni somatiche di *CDC73* in tumori di pazienti HPT-JT è stata ricercata esclusivamente a livello delle neoplasie paratiroidi. I tumori mandibolari, uterini e renali di persone affette dalla sindrome HPT-JT non sono mai stati caratterizzati per la presenza di LOH o di un secondo evento mutazionale a carico di *CDC73*.

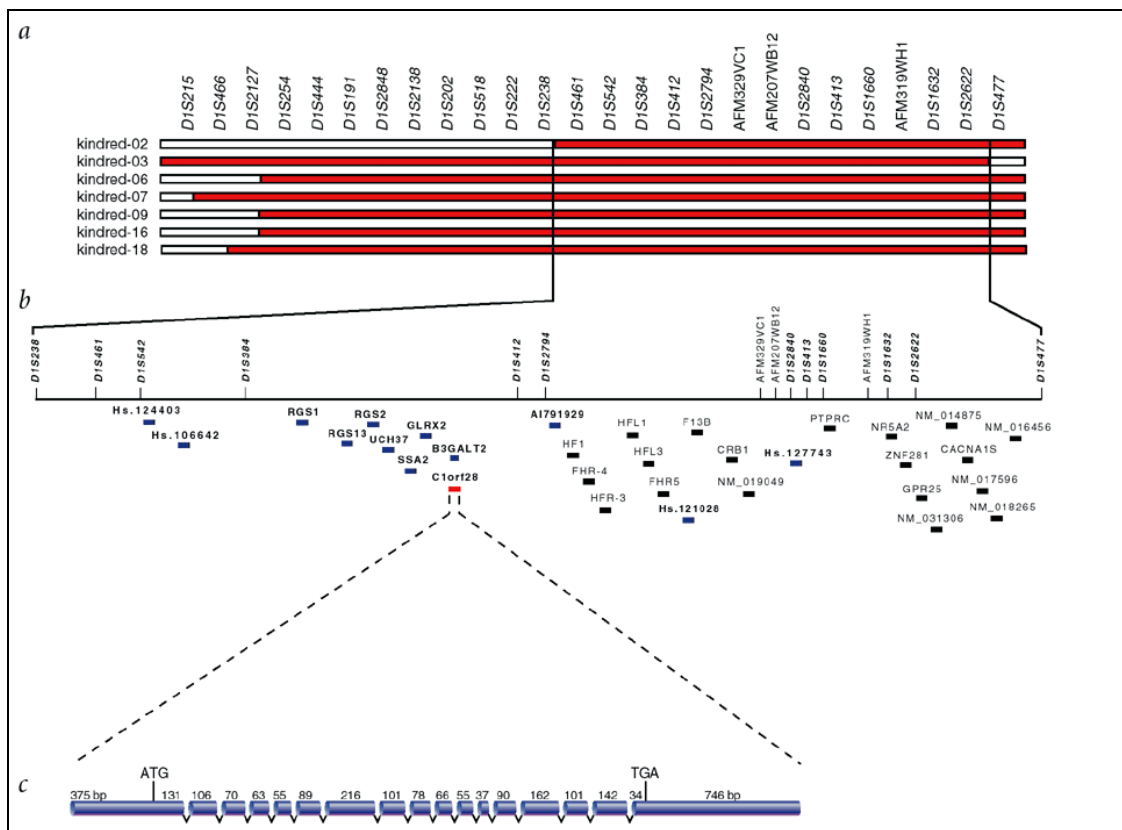


Figura 1.1. Schema del gene *HRPT2* (*CDC73*) secondo Carpten e colleghi

1.3 Funzioni di parafibromina

1.3.1. Parafibromina nel complesso Paf1

Come già precedentemente accennato, parafibromina è l'omologo umano della proteina Cdc73, che nel lievito è parte del complesso RNA polimerasi II/Paf1, importante per la modificazione degli istoni e per il collegamento ad eventi post-trascrizionali. Nel lievito, nel complesso Paf1 la delezione di Cdc73 risulta nella perdita della capacità di assemblaggio dei rimanenti componenti del complesso (Paf1, Leo1, Ctr9 e Rtf1) con la cromatina, e in una significativa riduzione nel legame di Paf1 alla RNA polimerasi II (Mueller et al., 2004). Nell'uomo, il complesso PAF1 è costituito da 5 subunità (hPaf1, hCtr9, hLeo1, hCdc73, hSki8). Nonostante le similarità tra il complesso PAF1 umano e quello del lievito siano evidenti, non è ancora del tutto chiaro in quale misura le loro proprietà funzionali si sovrappongano. Tra le caratteristiche condivise con il complesso di lievito, è noto che il complesso PAF1 umano si associa con la RNA polimerasi II lungo l'intera regione codificante dei geni trascrizionalmente attivi, indicando un ruolo del complesso stesso sia nell'inizio che nell'elongazione del trascritto. Inoltre, anche nell'uomo PAF1 interviene nella monoubiquitinazione dell'istone H2B e nella metilazione di H3K4. Esistono tuttavia anche delle funzioni che PAF1 umano non condivide con il corrispondente complesso in lievito; ad esempio, nell'uomo vi sono interazioni tra PAF1 e le vie di segnalazione di Wnt e Notch (Newey et al., 2009).

1.3.2. Repressione dell'espressione di ciclina D1

Una delle più rilevanti funzioni di parafibromina come oncosoppressore è la sua capacità di inibire l'espressione di ciclina D1, proteina che interviene in un punto di controllo critico della progressione del ciclo cellulare (dalla fase G1 alla fase S) ed è frequentemente iper-espressa nei tumori paratiroidei (Hemmer et al., 2001). L'insorgenza di neoplasie paratiroidee caratterizzate da ridotta espressione di parafibromina sembra quindi essere dovuta alla conseguente perdita dell'effetto inibitorio della proteina sull'espressione di ciclina D1 (Woodard et al., 2005). Un recente studio presente in letteratura ipotizza come meccanismo di azione di parafibromina a livello della trascrizione di ciclina D1 un' induzione della metilazione istonica su H3K9, dovuta ad un'interazione di parafibromina con l'istone metiltransferasi SUV39H1 (Yang et al., 2010).

1.3.3. Repressione dell'espressione di c-Myc

Parafibromina, nel contesto del complesso multiproteico Paf1, è in grado di mediare la repressione dell'espressione del protooncogene c-Myc. Infatti parafibromina, oltre ad altri componenti di Paf1, è in grado di legarsi al promotore di c-Myc e di esercitare un ruolo inibitorio nella sua espressione (*Lin et al., 2008*). Il proto oncogene c-Myc stimola fortemente la proliferazione cellulare ed è iperespresso in molti tumori umani. L'inattivazione di parafibromina può quindi favorire, almeno in parte, l'insorgenza di neoplasie per la perdita del suo ruolo inibitorio su c-Myc.

1.3.4. Parafibromina sembra intervenire nel controllo della traduzione proteica

Parafibromina sembra esercitare la sua funzione oncosoppressiva anche attraverso il controllo dell'espressione del gene *CPEB1* (*cytoplasmic polyadenylation element binding protein*). *CPEB1* codifica per una proteina che si lega all'RNA ed è un componente del complesso di inizio della traduzione eIF-4E, che regola la traduzione proteica reprimendo o facilitando la poliadenilazione di mRNA dotati di *cap* all'estremità 5'. Infatti, come recentemente dimostrato, uno *knockdown* per parafibromina indotto in cellule di mammifero riduce i livelli di espressione di CPEB1, grazie ad un'interazione diretta tra parafibromina (e altri componenti del complesso Paf1) con le sequenze regolatrici della trascrizione di CPEB1. Tale risultato sembra indicare che parafibromina possa, attraverso la sua interazione con CPEB1, esercitare un effetto regolatore indiretto anche sulla traduzione di alcuni geni. In particolare, una predizione bioinformatica mostra che esiste un elevato grado di sovrapposizione tra i geni target la cui espressione è regolata da parafibromina e quelli regolati da CPEB1 (*Zhang et al., 2010*).

1.3.5. Parafibromina nella pathway di Wnt

Inaspettatamente, parafibromina sembra avere un ruolo anche nella via di segnalazione intracellulare di Wnt, che svolge un ruolo fondamentale nella determinazione dei destini cellulari, nell'omeostasi tissutale e nello sviluppo dei tumori. Parafibromina interagisce infatti, tramite i suoi aminoacidi 218–263, con la regione C-terminale di β -catenina, un fattore chiave nella via di Wnt. Parafibromina sembra avere un ruolo positivo nella via di segnalazione Wnt, e questo dato sembra essere in contrasto con il ruolo di oncosoppressore di *CDC73*. E' stato quindi postulato che i target trascrizionali di parafibromina a livello paratiroideo codifichino per molecole che regolano la

proliferazione cellulare in senso negativo (*Mosimann et al., 2006*). Un recente studio indica che parafibromina sia bersaglio dell'azione della tirosin-fosfatasi SHP2, la cui azione defosforilativa ha, al contrario di altre fosfatasi, carattere attivante. La defosforilazione di parafibromina su specifiche tirosine sembra rendere più stabile la sua interazione con β -catenina (*Takahashi et al., 2011*). Questi studi indicano che, in particolari condizioni, parafibromina possa essere convertita da oncosoppressore in proto-oncogene, agendo nella via Wnt, che è implicata nella regolazione proliferazione, differenziamento, apoptosi e sopravvivenza cellulare.

1.3.6. Interazione di parafibromina con il Large T antigen di SV40.

Parafibromina sembra avere un ruolo di stimolatore della crescita e della proliferazione cellulare non solo attraverso la sua interazione con β -catenina; infatti, la proteina sembra esercitare un'attività oncogena anche attraverso un'interazione con il Large T antigen (LT) del virus SV40. Esperimenti condotti nelle linee cellulari 293FT e COS7 dimostrano che la trasfezione di parafibromina induce un aumento della percentuale di cellule nella fase S del ciclo cellulare, e sembra quindi stimolare crescita e proliferazione cellulare in presenza di espressione di LT. Il dominio di interazione di parafibromina con LT è compreso tra gli amminoacidi 218 e 263, ed è quindi sovrapponibile al dominio di legame con β -catenina. Tale fatto sembra suggerire che parafibromina utilizzi un sito di interazione comune per legare proteine che stimolano la trascrizione (*Iwata et al., 2007*): è possibile che, attraverso questa interazione fisica, parafibromina stimoli l'attività trascrizionale dei geni target di β -catenina e LT.

1.3.7. Parafibromina nella pathway di Hedgehog

Parafibromina risulta legata anche alla via Hedgehog (Hh), un'altra pathway molto conservata nel corso dell'evoluzione, che media il controllo dell'espressione dei suoi geni target attraverso i fattori di trascrizione della famiglia Gli/Ci. La via Hedgehog è coinvolta nella regolazione dello sviluppo embrionale e nell'omeostasi dei tessuti: un suo alterato funzionamento può portare allo sviluppo di diverse condizioni patologiche, tra cui alcune neoplasie. Parafibromina sembra essere coinvolta nell'induzione della trascrizione dei geni target della pathway di Hedgehog. In particolare, parafibromina è in grado di legarsi a tutti i tre membri della famiglia dei fattori di trascrizione Gli, legandosi direttamente al loro dominio di interazione con Su(fu), presente nella porzione N-terminale di tutti i fattori Gli e Ci. La regione di parafibromina interessata all'interazione con le proteine Gli comprende invece gli amminoacidi 200-343, che

contengono anche i residui necessari al legame con β -catenina e con LT (*Mosimann et al., 2009*). In conclusione, le proteine Gli, β -catenina e LT sembrano utilizzare un sito comune per il legame con parafibromina, forse per poter interagire con il complesso Paf1 per incrementare l'espressione dei loro geni target.

1.3.8. Ruolo di parafibromina nel citoplasma

In accordo con la maggior parte dei ruoli che le vengono attribuiti, parafibromina è prevalentemente una proteina nucleare, anche se alcuni studi ne riportano la presenza anche nel citoplasma (*Woodard et al., 2005; Porzionato et al., 2006*). La proteina presenta un dominio di localizzazione nucleare (NLS) funzionalmente attivo a livello dei residui 136–139 (*Bradley et al., 2007*) e tre putativi segnali di localizzazione nucleolare costituiti dagli aminoacidi 76-92, 192-194 e 393-409 (*Hahn et al., 2007*). Tuttavia, parafibromina sembra avere delle funzioni anche al di fuori del nucleo: infatti, essa interagisce con proteine citoplasmatiche strutturali quali actinina-2 e actinina-3, che intervengono nell'organizzazione dei filamenti citoscheletrici di actina (*Agarwal et al., 2008*). Questa interazione con le actinine, probabilmente, avviene quando parafibromina, in risposta a determinati segnali intracellulari, si accumula nel citoplasma. Il significato biologico di questa interazione e della sua funzione necessitano però di ulteriori approfondimenti.

1.3.9. Funzione di parafibromina nello sviluppo embrionale

Per investigare ulteriormente la funzione di parafibromina sia a livello di sviluppo embrionale che di organismo adulto, è stato creato un modello murino knockout (KO): l'omozigote KO *Hrpt2* *-/-* mostra letalità in una fase molto precoce dello sviluppo embrionale, precisamente entro la prima settimana di sviluppo. Invece, la delezione controllata di *Hrpt2* dopo l'ottavo giorno di vita embrionale risulta in apoptosi e ritardo nell'accrescimento. Per quanto concerne l'organismo adulto, la delezione di *Hrpt2* nel topo adulto determina una grave cachessia e porta a morte dell'animale entro 20 giorni (*Wang et al., 2008*). Complessivamente, questi dati sembrano indicare che parafibromina sia coinvolta, nei mammiferi, anche nella regolazione dello sviluppo embrionale e in meccanismi che consentono la sopravvivenza dell'adulto.

1.4. Mutazioni di *CDC73*

Le mutazioni di *CDC73* riportate in letteratura, secondo una recente revisione di Newey (*Newey et al., 2010*) sono in totale 106. Il 60% circa (n=68) di queste mutazioni è

germinale, mentre il 35% (n=38) è di origine somatica. Riguardo alla tipologia di queste mutazioni, il 13% è costituito da mutazioni missenso, il 29% da mutazioni nonsense, il 50% da delezioni o inserzioni *frameshift*, il 6% da mutazioni in siti di splicing e il 2% da inserzioni e delezioni *in-frame*. Come mostra la figura 4, la maggior parte delle mutazioni germinali e somatiche sono mutazioni *frameshift* (54% vs. 42% rispettivamente) seguite dalle mutazioni nonsense (24% vs. 37%) e missenso (15% vs. 11%).

Recentemente, sono stati riportati in letteratura anche due casi di delezione dell'intero gene (*Cascon et al., 2011; Domingues et al., 2012*).

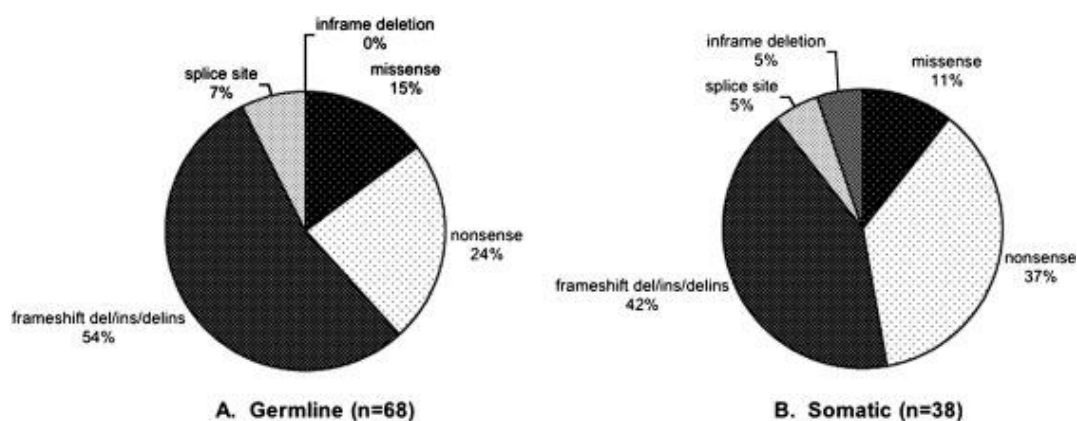


Figura 1.2. Frequenza delle tipologie di mutazioni germinali e somatiche di *CDC73* (da *Newey et al., 2010*)

Le mutazioni germinali di *CDC73* sono state identificate non solo in pazienti con HPT-JT, ma anche in pazienti con carcinomi e adenomi paratiroidei sporadici, fibromi ossificanti mandibolari sporadici e iperparatiroidismo familiare isolato (FIHP). Uno studio condotto dal nostro gruppo di ricerca su pazienti affetti da HPT-JT e FIHP ha individuato caratteristiche cliniche, genetiche e istopatologiche in comune tra le due sindromi tali da poter ipotizzare che l'iperparatiroidismo familiare isolato possa rappresentare una variante fenotipica con penetranza incompleta della sindrome HPT-JT (*Masi et al., 2008*). Per quanto riguarda le mutazioni somatiche di *CDC73*, anche queste sono state identificate in pazienti con carcinomi e adenomi paratiroidei sporadici, tumori renali e fibromi ossificanti mandibolari.

1.5. Effetti funzionali delle mutazioni di *CDC73*

Come riportato precedentemente, più del 75% delle mutazioni di *CDC73* sono *frameshift* e nonsense e risultano nella sintesi di una proteina tronca o di una forma inattiva di parafibromina (*Newey et al., 2010*). Le mutazioni associate al prematuro

troncamento di parafibromina sembrano portare alla perdita di alcuni domini funzionali, come il segnale di localizzazione nucleare o i domini di interazione con Paf1 o β -catenina. Per quanto riguarda le mutazioni missenso, le loro conseguenze funzionali sono molto più difficili da predire. Le mutazioni missenso possono portare a inattivazione di amminoacidi critici perché coinvolti in interazioni con altre proteine, ad un'alterazione nel corretto *fold*ing della proteina, ad una sua ridotta stabilità o ad un incremento nella sua degradazione. Le conseguenze funzionali delle mutazioni missenso di parafibromina, però, sono difficili da predire, in quanto in essa non sono ancora stati riconosciuti particolari domini strutturali e la sua struttura cristallografica non è a tutt'oggi nota. Come evidenziato in figura 1.3, che rappresenta schematicamente parafibromina e i suoi domini di interazione con altre proteine, un elevato numero di mutazioni missenso di parafibromina interessa amminoacidi situati nella sua porzione N-terminale, la cui funzione non è attualmente ancora caratterizzata.

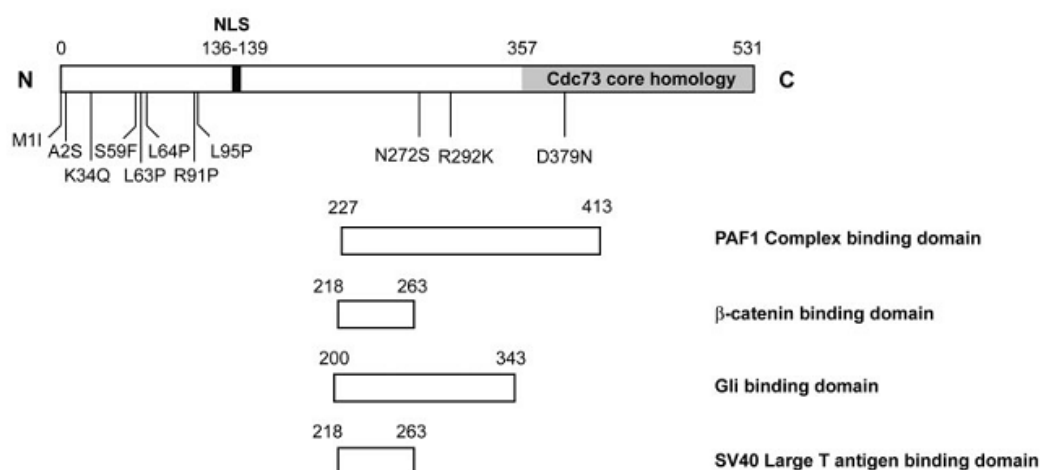


Figura 1.3. Rappresentazione schematica di parafibromina. Sono evidenziate le mutazioni missenso note ed alcuni domini di interazione con altre proteine (da Newey *et al.*, 2010)

La mutazione missenso Leu64Pro, più volte identificata in tumori paratiroidi e forme familiari di iperparatiroidismo primitivo (Howell *et al.*, 2003; Villablanca *et al.*, 2004) è stata parzialmente caratterizzata dal punto di vista funzionale nello studio di Woodard e colleghi (Woodard *et al.*, 2005) che dimostra che la trasfezione di parafibromina Leu64Pro in cellule NIH3T3 e HEK293 non inibisce la proliferazione cellulare, diversamente dalla trasfezione con parafibromina *wild-type*. Inoltre, mentre l'iperespressione di parafibromina nella sua forma normale inibisce fortemente l'espressione di Ciclina D1, la trasfezione del mutante Leu64Pro non sembra avere tale

effetto. Un altro esempio di mutazione missenso individuata e caratterizzata di recente è dato dalla mutazione Leu95Pro, che comporta la sostituzione dell'amminoacido Leucina con una Prolina al residuo 95, dovuta a una transizione germinale T → C nell'esone 3 di *CDC73* (Panicker et al., 2010). Lo studio *in vitro* della mutazione in cellule HeLa, HEK293A e NIH3T3, dimostra che parafibromina Leu95Pro mantiene l'abilità di interagire con i componenti del complesso PAF1, ma è espressa a livello inferiore rispetto alla sua forma *wild-type*. Tale differenza nel livello di espressione non sembra essere dovuta ad un incremento della degradazione proteasomica della proteina mutata, come avviene per altri oncosoppressori.

Parafibromina Leu95Pro, inoltre, mantiene la sua localizzazione nucleare ma non quella nucleolare. A livello funzionale, infine, la trasfezione di parafibromina mutata sembra promuovere la sopravvivenza e la proliferazione cellulare rispetto alla trasfezione della proteina *wild-type*. La combinazione della perdita della localizzazione nucleolare con l'acquisizione di un fenotipo che porta ad incremento della proliferazione cellulare porta a ipotizzare che parafibromina debba interagire con target a livello nucleolare per adempiere al suo ruolo di oncosoppressore.

2. Tumori paratiroidei sporadici

2.1 Ruolo di *CDC73* nella patogenesi dei tumori paratiroidei sporadici

Tutti gli studi presenti in letteratura riguardanti i tumori paratiroidei sporadici sono concordi nell'affermare un ruolo di *CDC73* nella patogenesi dei carcinomi: mutazioni somatiche inattivanti a carico del gene vengono infatti riscontrate, complessivamente, nel 77% dei casi di tumore paratiroideo maligno esaminati (Shattuck et al., 2003; Howell et al., 2003; Cetani et al., 2004). Per quanto riguarda i tumori benigni, al contrario, *CDC73* non sembra avere un ruolo patogenetico di primo piano, dato che alterazioni in questo gene sono state riscontrate in pochissimi casi di adenoma paratiroideo, ossia nello 0-4% delle casistiche esaminate (Carpten et al., 2002; Howell et al., 2003; Krebs et al., 2005; Bradley et al., 2006; Juhlin et al., 2006). Di particolare interesse, inoltre, è il fatto che, a differenza degli adenomi, un'elevata percentuale di carcinomi paratiroidei sporadici mostrano una forte perdita di immunoreattività per la parafibromina. L'assenza di espressione della proteina è, nella quasi totalità dei tessuti studiati, in correlazione con la presenza di un'anomalia a carico di *CDC73* (Tan et al., 2004; Gill et al., 2006; Cetani et al., 2007a).

Secondo questi studi, quindi, la negatività per parafibromina, sembra essere altamente specifica per la diagnosi di carcinoma paratiroideo, e può essere di ausilio nei molti casi in cui la diagnosi istopatologica di questa neoplasia è incerta. Tuttavia, nonostante un'eccellente specificità, la negatività per parafibromina sembra essere relativamente poco sensibile per la diagnosi di carcinoma. Le sensibilità riportate in letteratura variano dal 23%, quando come *gold standard* vengono impiegati criteri istopatologici, al 70% quando il *gold standard* è dato dall'osservazione, nel tumore, di un comportamento biologico indicativo di malignità (presenza di metastasi e recidive) (Howell et al., 2009). Quindi, indipendentemente dal *gold standard* considerato, appare evidente che non tutti i carcinomi paratiroidi sono negativi per parafibromina, e che sia necessario, oltre allo studio dell'espressione di parafibromina, anche quello di altri marcatori molecolari per ottimizzare la diagnosi di benignità o malignità dei tumori paratiroidi sporadici.

2.2 Altri potenziali marcatori immunoistochimici di malignità per i tumori paratiroidi sporadici

2.2.1. PGP9.5

Una delle proteine studiate come possibili marcatori di malignità per i tumori paratiroidi sporadici è PGP9.5 (*protein gene product 9.5*), codificata dal gene *UCHL1*. Questa proteina è espressa da tessuto neuronale e neuroendocrino e anche durante lo sviluppo embrionale delle ghiandole paratiroidi. Un incremento della sua espressione è presente in diversi tipi di neoplasie e in alcuni casi sembra essere associato con uno stadio tumorale più avanzato (Howell et al., 2009). Per quanto riguarda i tumori paratiroidi, la presenza di un'intensa immunoreattività per PGP 9.5 sembra avere elevate sensibilità e specificità per l'identificazione dei carcinomi paratiroidi in tumori che mostrano carattere di malignità. Gli autori dello studio concludono che la positività per PGP 9.5 possa essere affiancata alla negatività per parafibromina come marker di malignità, e che possa avere anche una sensibilità leggermente superiore (e uguale elevata specificità) a quella di parafibromina nella diagnosi di carcinoma paratiroideo. Una diffusa positività per PGP 9.5, inoltre, appare strettamente correlata a completa negatività per parafibromina e a comportamento biologico maligno del tumore paratiroideo (Howell et al., 2009).

2.2.2. APC

Tra i possibili marcatori molecolari da affiancare a parafibromina nella identificazione istopatologica dei carcinomi paratiroidei, risultano di sicuro interesse proteine appartenenti alla pathway di Wnt, che, come precedentemente descritto, risulta essere funzionalmente legata a parafibromina. Juhlin e colleghi (*Juhlin et al., 2009*) valutano inizialmente l'espressione di APC (*adenomatous polyposis coli*) e GSK-3- β (*glycogen synthase kinase 3 β*) tramite immunohistochimica in tessuti di carcinoma paratiroideo. Gli autori concludono che la perdita di immunoreattività per l'oncosoppressore APC mostra elevate sensibilità e specificità per i tumori paratiroidei maligni. Infatti, nello studio, la maggior parte dei carcinomi paratiroidei esibisce riduzione o perdita di espressione di APC, così come i casi con evidenze cliniche di comportamento maligno (recidive locali o metastasi). Successivamente, lo stesso gruppo di ricerca valuta l'espressione di APC unitamente a quella di parafibromina come possibile marcatore di malignità negli adenomi paratiroidei atipici, ovvero in quei casi di tumore paratiroideo che non mostrano un completo fenotipo maligno, ma che esibiscono a vari livelli caratteristiche istopatologiche atipiche, frequenti nei carcinomi ma non comunemente presenti nelle lesioni benigne (*Juhlin et al., 2010*). Lo studio dimostra che molti adenomi paratiroidei atipici sono privi di immunoreattività per APC e, allo stesso tempo, una parziale perdita di espressione nucleare di parafibromina, e suggerisce che i casi di adenoma atipici negativi per APC debbano essere seguiti con un follow-up più attento; infatti, questa caratteristica immunohistochimica viene frequentemente rilevata nelle lesioni effettivamente maligne, piuttosto che in quelle benigne. Inoltre, APC sembra conferire una più elevata specificità rispetto a parafibromina nello screening per i tumori paratiroidei maligni; tuttavia, la potenzialità dell'immunohistochimica anti-parafibromina nell'identificazione di possibili casi familiari con mutazioni germinali di *CDC73* rende questa proteina un utile marker da unire ad APC nella valutazione dei tumori paratiroidei atipici.

2.3 I microRNA

2.3.1. Cenni su funzione e biogenesi dei microRNA

I microRNA maturi (miRNA) sono molecole di RNA a singolo filamento, non codificante, della lunghezza di 20-23 nucleotidi. I miRNA sono coinvolti nella regolazione dell'espressione genica riducendo, tipicamente, la stabilità degli mRNA. In particolare, l'azione a livello di mRNA si esplica attraverso l'appaiamento di basi

complementari tra l'estremità 5' del miRNA (la regione *seed*) e una porzione di mRNA, tipicamente posta nella UTR 3' del trascritto.

Per quanto riguarda la loro biogenesi, i miRNA vengono usualmente trascritti dalla RNA polimerasi II a partire da geni che li codificano (miRNA canonici), oppure vengono trascritti partendo dagli introni di geni codificanti (mirtroni).

I miRNA canonici vengono in principio sintetizzati come lunghe molecole, definite pri-miRNA, lunghe circa 70 nucleotidi e contenenti una struttura ad *hairpin*. Tali molecole vengono processate, nel nucleo, ad opera dell'endoribonucleasi Drosha e del suo partner molecolare DGCR8; i mirtroni vengono invece processati dallo spliceosoma. I pre-miRNA risultanti da entrambi i processi vengono trasportati nel citoplasma, dove subiscono un'ulteriore fase di maturazione grazie all'azione di un'altra endoribonucleasi, chiamata Dicer, che agisce insieme a TRBP. Viene così generato il miRNA maturo, della lunghezza di 21-23 nucleotidi, che esplica la sua funzione agendo insieme a proteine della famiglia Argonaute (AGO) per formare il complesso miRISC (*miRNA-induced silencing complex*) (Figura 1.4).

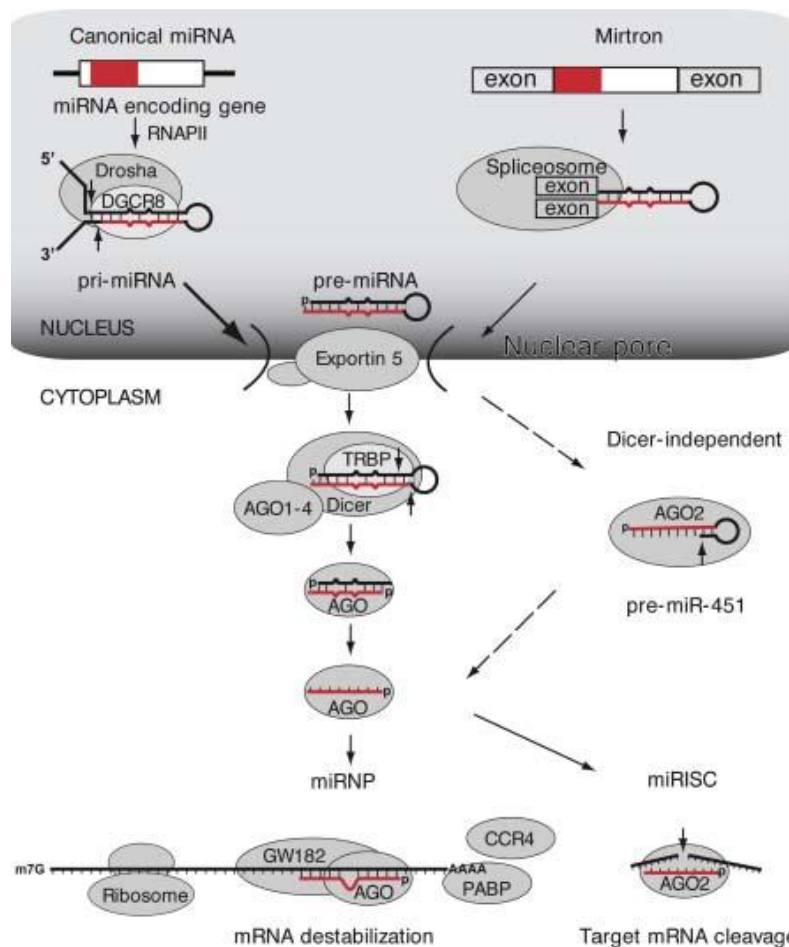


Figura 1.4. Schema della biogenesi dei miRNA (da Farazi *et al.*, 2011)

2.3.2. I miRNA nei tumori

I miRNA, regolando l'espressione di gran parte dei geni (circa il 60%), hanno grande impatto su molti processi cellulari quali differenziamento, proliferazione e sopravvivenza cellulari e sono, di conseguenza, spesso implicati in meccanismi di tumorigenesi. Gli effetti della disregolazione dell'espressione dei miRNA su insorgenza, mantenimento o metastasi tumorale si spiegano osservando gli mRNA target e le vie di segnalazione in cui essi agiscono. Dato che i miRNA regolano numerosi geni, è molto difficile attribuire un fenotipo ad alterazione nell'espressione di un singolo miRNA che agisce su un gruppo dei suoi possibili bersagli. Se alcuni dei target però controllano fattori limitanti nel processo di tumorigenesi oggetto di studio, in un particolare tessuto o tipo cellulare, allora l'azione del miRNA su pochi dei suoi target potrebbe spiegare l'insorgenza del fenotipo neoplastico.

Negli ultimi anni sono stati identificati numerosi miRNAs implicati nell'insorgenza di diversi tipi di neoplasie; in particolare, sono stati descritti sia miRNA che fungono da oncosoppressori (i cui target codificano per proteine con attività oncogenica) che miRNA oncogeni (OncomiRs) che regolano in senso negativo l'attività di mRNA codificanti oncosoppressori. Alcuni dei miRNA più comunemente alterati in diversi tipi di neoplasie sono riportati in tabella 1.1.

miRNA	Specificità tissutale	Posizione cromosomica	Attività	Neoplasia
Fam. Let-7	ubiquitaria	Cr. 3, 9, 11, 19, 21, 22	TS	CLL, linfoma, stomaco, polmone, prostata, mammella, ovaio, colon, leiomioma, melanoma
Cluster miR-15a/16-1	ubiquitario	13q14.2	TS	CLL, linfoma, mieloma multiplo, adenoma ipofisario, prostata, pancreas
Fam. miR-17-92	ubiquitaria	Cr. 7, 13, X	OG	Linfoma, mieloma multiplo, polmone, colon, medulloblastoma, mammella, prostata
miR-21	ubiquitario	17q23.1	OG	Linfoma, mammella, polmone, prostata, stomaco, testa e collo, colo rettale, glioblastoma
miR-26a	ubiquitario	3p22.2, 12q14.1	TS OG	Linfoma, carcinoma epatocellulare, carcinoma tiroideo, glioblastoma
miR-34a/b/c	ubiquitario	1p36.22 11q23.1	TS	CLL, linfoma, pancreas, colon, neuroblastoma, glioblastoma
miR-155	Sistema ematopoietico	21q21.3	OG	Linfoma, CLL, mammella
Fam. miR-200/141	epiteliale	Cr. 1 e 12	OG/TS	Mammella, rene, stomaco, vescica
miR-205	epiteliale	1q32.2	OG/TS	Prostata, vescica, mammella, esofago, ovaio
miR-206	Muscolo scheletrico	6p12.2	TS	Rabdomiosarcoma, mammella
miR-9	ubiquitario	1q22, 5q14.3 15q26.1	OG/TS	Medulloblastoma, ovaio, mammella

Tabella 1.1. (adattata da *Farazi et al., 2011*): Esempi di miRNA la cui espressione è frequentemente alterata in alcune neoplasie. OG: oncogenico; TS: oncosoppressore

2.3.3. MiRNA profiling nei tumori: applicazioni cliniche

Nei tumori, la combinazione dello studio del profilo di espressione dei miRNA, unitamente al profilo di espressione genica, può aiutare a comprendere la complessità degli eventi molecolari che si verificano nelle cellule neoplastiche. A livello di diagnostica molecolare, invece, l'uso delle *signatures* dei miRNA sembra essere preferibile al tradizionale approccio di studio dell'espressione genica. Infatti, i miRNA,

rispetto agli mRNA, sono dotati di maggiore stabilità e sono privi di varianti trascrizionali (come varianti di splicing o isoforme). Inoltre, i pattern di alterata espressione dei miRNA, quando confrontati con i pattern di disregolazione degli mRNA, sono più utili nell'identificazione di tumori la cui origine è ignota, perché risultano disseminati in molteplici siti metastatici, suggerendo che i tumori mantengono più facilmente un profilo di espressione di miRNA tessuto-specifico.

Il miRNA *profiling* può aiutare a distinguere tra neoplasie simili e fornire indicazioni riguardo alla tipologia di tumore, alle mutazioni eventualmente ad esso associate e anche alla possibile risposta alla terapia. (figura 1.5).

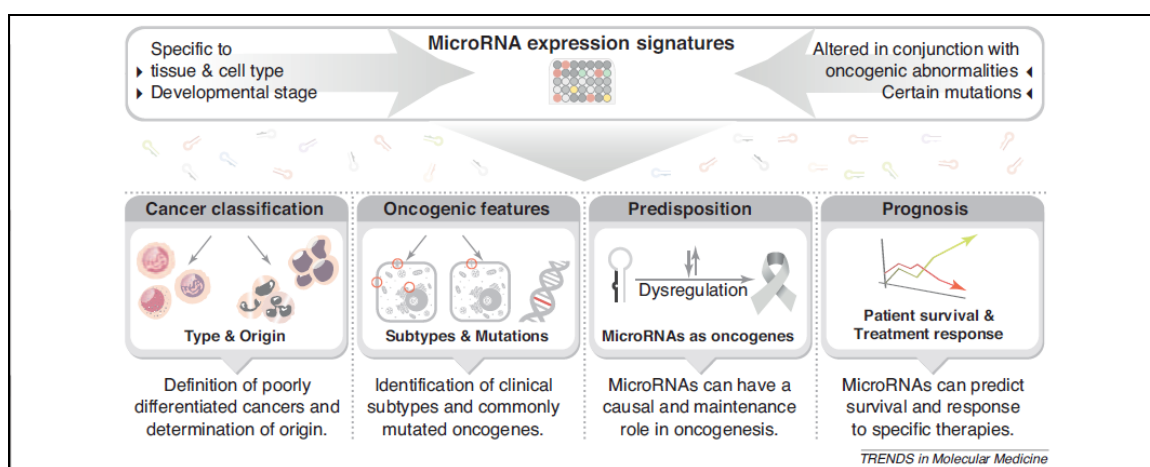


Figura 1.5. (da Chan *et al.*, 2011) Schema delle potenzialità del miRNA *profiling* in diagnosi e prognosi nei tumori

Attualmente, molti gruppi di ricerca hanno caratterizzato *signatures* di miRNA che si associano a diversi sottotipi di carcinoma, consentendo anche di individuare meccanismi molecolari specifici di individuali sottotipi. Ad esempio, lo studio del profilo di espressione dei miRNA ha identificato diversi miRNA differenzialmente espressi tra carcinomi della mammella basali e luminali, e che consentono di classificare le caratteristiche della neoplasia riguardo allo stato dei recettori per estrogeni e progesterone e HER2/neu. (Sempere *et al.*, 2007; Blenkiron *et al.*, 2007; Lowery *et al.*, 2009). In tabella 1.2 (da Chan *et al.*, 2011) sono riportati alcuni esempi di sottotipi di tumori solidi che possono essere distinti in base al loro profili di espressione di miRNA.

Tipo di tumore	miRNA
Mammella	
Stato ER	miR-26a/b, fam. miR-30, miR-29b, miR-155, miR-342, miR-206, miR-191
Stato PR	Let-7c, miR29b, miR-26a, fam. miR30, miR520g
Stato Her2/neu	miR-520d, miR-181c, miR-302-c, miR-376b, miR-30e
Polmone	
Squamoso vs. non	miR-205
Small cell vs. non	miR-17-5p, miR-22, miR-24, miR-31
Stomaco	
Diffuso vs.intestinale	miR-29b/c, fam miR30, miR-135a/b
Endometrio	
Endometriode vs. papillare	miR-19a/b, miR-30e-5p, miR-101, miR-452, miR-382, miR-15a, miR-29c
Rene	
Cellule chiare vs. papillare	miR-424, miR-203, miR-31, miR-126

Tabella1.2. (adattata da Chan et al., 2011): Alcuni sottotipi di neoplasie che possono essere distinti sulla base del loro profilo di espressione di miRNA

2.3.4. I miRNA nei tumori paratiroidei

Considerando il ruolo che il miRNA *profiling* può avere nello studio della biologia dei tumori, nella loro classificazione in sottotipi e nell'identificazione di marcatori diagnostici e prognostici, questo tipo di approccio risulta particolarmente utile nello studio delle neoplasie paratiroidee sporadiche, che non sono ancora del tutto caratterizzate dal punto di vista molecolare. In particolare, l'identificazione di miRNA espressi diversamente in carcinomi e adenomi paratiroidei potrebbe essere di considerevole aiuto nei molti casi in cui il carattere di malignità del tumore non è evidente e la diagnosi istopatologica risulta incerta.

Attualmente, nonostante il ruolo dei miRNA sia stato estensivamente studiato in molti tumori endocrini, in letteratura sono presenti solo due studi sul profilo di espressione di miRNA nei tumori paratiroidei sporadici.

La presenza di due soli studi in letteratura sull'espressione di miRNA nei tumori paratiroidei può essere ascrivibile a due motivi principali: innanzitutto, la rarità dei carcinomi paratiroidei, che hanno una prevalenza di 5.7/ 10 000 000 (*Lee et al., 2007*). Secondariamente, la difficoltà nell'ottenere tessuto paratiroideo umano normale da utilizzare come controllo, dal momento che ghiandole paratiroidee normali si ottengono per rimozione accidentale nel corso di interventi chirurgici per patologie tiroidee.

Nel primo lavoro presente in letteratura (*Corbetta et al., 2010*), la casistica esaminata comprende 4 carcinomi che vengono comparati con 2 biopsie di paratiroidei normali. L'analisi viene effettuata tramite miRNA- microarrays a bassa densità, basati su una tecnica di *q-PCR*, che consentono di studiare l'espressione di 362 miRNA umani.

Lo studio identifica in primo luogo numerosi miRNA la cui espressione varia tra carcinomi e tessuto normale: un approccio di *unsupervised hierarchical clustering* è infatti in grado di discriminare correttamente tra tumori e tessuti normali. Successivamente, attraverso l'utilizzo di un'analisi univariata (test *t*) vengono identificati 17 miRNA la cui espressione è significativamente alterata nei carcinomi, con 14 miRNA sottoespressi e 3 iperespressi nei tumori paratiroidei rispetto alle biopsie di tessuto normale. Tra questi 17 miRNA, un'analisi SAM (*Significance Analysis of Microarrays*) permette di identificare 4 microRNA come significativamente alterati (*False Discovery Rate* =0) e, in particolare, evidenzia due microRNA significativamente iperespressi (miR-503 e miR-222) e due sottoespressi (miR-296 e miR-139) nei carcinomi rispetto a tessuti paratiroidei normali.

Viene quindi effettuata una ricerca *in silico* dei potenziali target dei microRNA alterati, che identifica come potenziali bersagli di interesse le proteine HGS, p27/Kip1, e ciclina D1, come putativi target di miR-296, miR-222, and miR-503 rispettivamente. L'espressione di queste proteine viene investigata tramite analisi immunohistochimica in una casistica di tessuti comprendente anche 26 adenomi; viene dimostrato un aumento dell'immunoreattività per HGS nei carcinomi rispetto agli adenomi ed ai tessuti paratiroidei normali. Al contrario, l'espressione nucleare di p27/Kip1 risulta ridotta o assente nei tessuti neoplastici, mentre ciclina D1 è presente a bassi livelli nel tessuto normale e mostra elevata espressione in molti adenomi e nei carcinomi. Questi risultati suggeriscono quindi che, a livello paratiroideo, HGS e p27/Kip1 possano effettivamente

essere target rispettivamente di miR-296 e miR-222. Viene inoltre escluso che miR-503, iperespresso nei carcinomi, possa agire come modulatore dell'espressione di ciclina D1. Il secondo studio che investiga il ruolo dei miRNA nella tumorigenesi paratiroidea (Rahbari *et al.*, 2011) differisce sostanzialmente dal primo per composizione e numerosità della casistica di campioni studiata. Infatti, il lavoro di Rahbari e colleghi prende in esame un elevato numero di tumori paratiroidi (12 adenomi, 9 carcinomi e 15 iperplasie), che vengono confrontati con 4 paratiroidi normali impiegate come controllo. Anche il numero di miRNA analizzati è superiore a quello dello studio di Corbetta e colleghi, in quanto vengono impiegati miRNA-microarrays che rappresentano un totale di 825 miRNA umani.

Anche in questo caso *l'unsupervised hierarchical analysis* è in grado di raggruppare correttamente insieme i carcinomi paratiroidi sulla base del loro profilo di espressione di miRNA. Inoltre, un approccio di supervised cluster analysis consente una corretta distinzione tra tumori paratiroidi benigni e maligni. Vengono identificati 91 microRNA differenzialmente espressi tra adenomi e carcinomi, tra i quali 24 risultano avere $FDR \leq 0.01$.

L'espressione di tre miRNA, ovvero miR-26b, miR-30b, e miR-126*, risulta essere significativamente inferiore nei carcinomi rispetto agli adenomi, e il livello di miR-126* viene considerato il miglior differenziatore tra tumori paratiroidi benigni e maligni.

Lo studio conclude sottolineando che miR-126 è stato precedentemente collegato a fenomeni di tumorigenesi attraverso l'interazione con il suo target EGFL7, ma non effettua ulteriori analisi di espressione dei putativi target dei miRNA identificati nei tessuti paratiroidi impiegati, né validazioni di potenziali target di interesse.

I due studi presenti in letteratura su miRNA e tumori paratiroidi non possono essere paragonati tra di loro viste le differenze nella composizione delle casistiche studiate e nelle metodiche di laboratorio e di analisi impiegate. Tuttavia, un limite presente in entrambi i lavori è la mancanza di studi *in vitro* e di validazioni di target dei miRNA messi in evidenza dall'analisi con microarrays. Il ruolo dei miRNA nella tumorigenesi paratiroidea, quindi, necessita sicuramente di ulteriori approfondimenti.

CAPITOLO 2

SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo generale del presente studio è stato approfondire le conoscenze riguardo alle basi molecolari di forme familiari (sindrome HPT-JT) e sporadiche di iperparatiroidismo primitivo.

In dettaglio, gli scopi specifici sono stati:

- Accertare la presenza ed il ruolo di mutazioni di *CDC73* nel fibroma ossificante mandibolare, una delle neoplasie che insorgono nei soggetti affetti da sindrome HPT-JT.
- Ricercare, tramite un approccio di miRNA *profiling*, la presenza di miRNA differenzialmente espressi tra tumori paratiroidei sporadici benigni e maligni.
- Investigare se miR-9, un miRNA di interesse sulla base dei dati di *profiling* e da evidenze presenti in letteratura, ha come target *CDC73*.

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI

3.1. Studio del ruolo di *CDC73* nella patogenesi del fibroma ossificante mandibolare nella sindrome HPT-JT

3.1.1. Paziente HPT-JT

La ricerca di mutazioni nella sequenza codificante e nelle giunzioni esone-introne di *CDC73* è stata effettuata nel tessuto congelato di un fibroma ossificante mandibolare di una paziente proveniente da una famiglia HPT-JT precedentemente caratterizzata (Masi et al., 2008; Iacobone et al., 2009), il cui albero genealogico è rappresentato in figura 3.1.

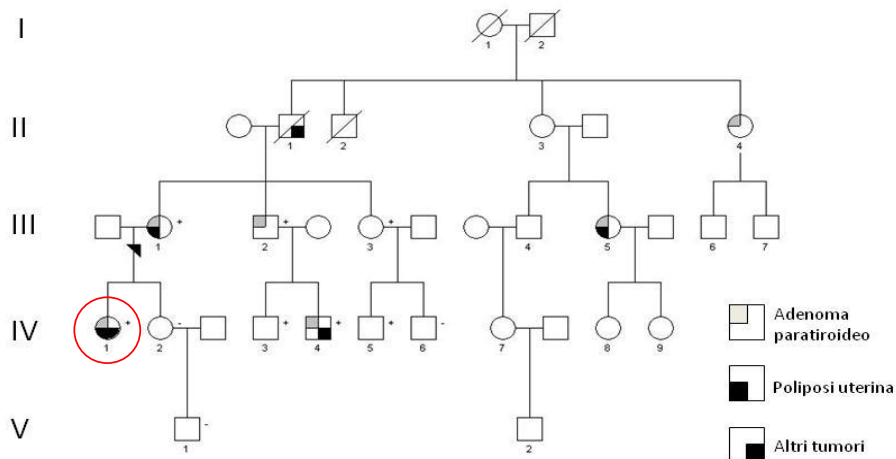


Figura 3.1. Albero genealogico della famiglia HPT-JT. La paziente IV, 1 evidenziata da un cerchio rosso, è stata studiata per la presenza di mutazioni somatiche di *CDC73* nel tessuto di un fibroma ossificante mandibolare.

La paziente all'età di 23 anni, è stata sottoposta a resezione chirurgica di un singolo adenoma paratiroidico; è risultata successivamente affetta anche da poliposi uterina e, all'età di 29 anni, ha sviluppato una massa mandibolare asportata chirurgicamente, le cui caratteristiche istopatologiche erano compatibili con la diagnosi di fibroma ossificante.

Dal punto di vista genetico, la paziente, come altri familiari affetti da iperparatiroidismo primitivo (III,1; III,2; IV,4) ed alcuni soggetti che sono risultati essere portatori sani, (III,3; IV,3; IV,5), presentava una mutazione germinale *frameshift* in eterozigosi di CDC73, ovvero una delezione di 5 nucleotidi nell'esone 2, descritta come c.(136_144)del5 e già precedentemente identificata in letteratura (Kelly *et al.*, 2006).

3.1.2. Estrazione di DNA da tessuto congelato, amplificazione e sequenziamento di CDC73

L'estrazione di DNA da tessuto è stata effettuata partendo da 20 mg circa di tessuto congelato, impiegando il *QIAamp® DNA Mini Kit* (Qiagen GmbH, Germany) come indicato dal produttore. L'intera sequenza codificante e le giunzioni esone-introne sono state amplificate tramite PCR e sequenziate usando primers scelti dalla letteratura (Shattuck *et al.*, 2003), riportati in tabella 3.1. I prodotti di amplificazione sono stati purificati usando il reagente *EXOSAP-IT* (USB corporation, Cleveland, Ohio, USA) e sequenziati con sequenziatore capillare Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems-Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Gli elettroferogrammi sono stati analizzati con Chromas Lite (Technelysium, Helensvale, Australia), e la potenziale patogenicità dell'alterazione identificata è stata stimata impiegando il software MutationTaster. (www.mutationtaster.org, Schwarz *et al.*, 2010).

Esone	Primers Foward	Primers Reverse	Lunghezza del prodotto di PCR (bp)	Temperatura di annealing (°C)
1	GAGGACGGCTGTTAGTGCT	CCCCTCTTTCCTTACCCTA	451	55
2	TAAATGAATCCAGCCTGAAG	AGGCCAGACCCTGTCTCT	251	58
3	AAAGTGCTGGGATTCTAGG	TGGACAAAAATGAAGGTAGG	599	58
4-5	AACATGTTTTTGCAGAGCTG ACCTAGAGAAAATCACCATA	CTCCTCAGGTTACTGCAATC	451	55
6	GGCCTAAAGACACTGATAACC	CGAACTTAAGAGCAAAGAGG	351	55
7	GAATGCCTGCTGTGAAAA	TGTGAAGGAGCTTGCATTT	502	55
8	CTCTGGATCAATATCTTAGTA GTGG	GTCTCAACGTTACTACACTG C	348	55
9	ATGGTCATGCTACTGCACTC	CCAACCCTTACCCTTAAACA	251	55
10	CAGAGATAGTCTTAACCAGCT TC	CTTCAACATGTGCTACTCACA T	348	55
11	AACATGTTTCAGTGGAGTAACC	TGCACTGTTACGATCTTTTG	251	55
12-13	TGGTTAACTGAAACTGCAGA	GTATCTCAATATCCTACGTAC AGG	713	58
14	ATCTTCCATTTTCATCACG	CCCCATCTTTAAAAAGCAA	321	55
15	TGCCTAAGGGATTTATAGTAG C	ACATCATATGCGCGAACT	281	55
16	GGCGTGTATAAACCTGAAT	GAAAGAAGGGAATTAGGGAA	401	55
17	GAGGAGTGTTATTTCTAGCTT ATTC	GATCAATCTGTGACCTTCTTC A	301	55

Tabella 3.1 Primers impiegati per l'amplificazione del gene *CDC73* e caratteristiche degli amplificati

3.1.3. Separazione degli alleli

Al fine di determinare se l'alterazione riscontrata a livello somatico e la mutazione germinale nota c.(136_144)del5 fossero effettivamente su alleli diversi, è stato effettuato un subclonaggio in un vettore plasmidico, seguito da propagazione del vettore e sequenziamento dell'inserto.

A tale scopo, l'amplificato relativo all'esone 2, contenente entrambe le alterazioni, è stato ligato nel vettore pGEM®-T Easy (Promega, Madison, WI, USA) (figura 3.2) seguendo il protocollo fornito dal produttore.

Il plasmide conferisce ai batteri resistenza all'ampicillina, per consentire la selezione; presenta inoltre il sito di clonaggio all'interno di una regione del gene *lacZ*, per permettere l'identificazione dei cloni ricombinanti: infatti, le cellule che hanno internalizzato il plasmide con l'inserto non sono più in grado di metabolizzare l'X-gal,

che produce un metabolita di colore blu. Le colonie di interesse risultano pertanto essere bianche.

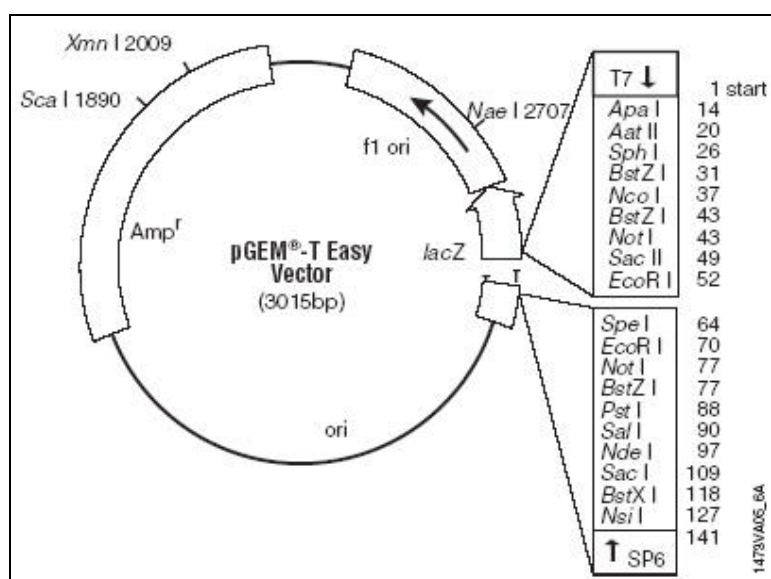


Fig. 3.2. Rappresentazione schematica del vettore pGEM®-T Easy (Promega).

Successivamente, il prodotto della ligazione tra vettore plasmidico e amplificato è stato trasformato mediante shock termico in cellule batteriche appartenenti al ceppo DH5α di *E. coli*. Le cellule trasformate sono state poi strisciate su piastre di LB agar addizionato di ampicillina 100 µg/ml e precedentemente trattate con X-gal (per selezionare le cellule in cui è correttamente ligato l'inserto). Le piastre con il prodotto di trasformazione sono state incubate per 16 ore O/N, e 12 colonie bianche sono state selezionate e fatte crescere in LB liquido con ampicillina 100 µg/ml per 16 ore a 37° C.

E' stata quindi effettuata una minipreparazione di DNA plasmidico, tecnica che consente l'estrazione di piccole quantità (fino a 15 µg) di plasmidi da cellule batteriche precedentemente trasformate. Tale estrazione è stata effettuata impiegando l'*High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) seguendo il protocollo fornito dal produttore. Il prodotto della minipreparazione è stato diluito 1:100 e sottoposto a ri-amplificazione e sequenziamento con i primers relativi all'esone 2 di *CDC73* (Tabella 3.1).

3.1.4. Linea cellulare e plasmidi di espressione impiegati

Tutti gli studi funzionali sono stati effettuati impiegando la linea cellulare immortalizzata di rene embrionale umano HEK293A (Q-BIOgene, Inc., CA, USA), mantenuta in terreno D-MEM addizionato con il 10% di FBS e l'1% di penicillina-streptomina (Gibco-Life Technologies), in incubazione a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂.

Per l'espressione della proteina codificata da *CDC73* è stato impiegato il plasmide *pCMV6-AC-GFP* (OriGene Technologies, Rockville, MD, USA), rappresentato in figura 3.3, contenente l' ORF umana di *CDC73*, codificante per parafibromina *wild-type*. L' ORF è coniugata, alla sua estremità C-terminale, con la sequenza codificante la proteina fluorescente verde GFP. La risultante proteina di fusione si trova sotto il controllo trascrizionale del promotore di CMV.

Come controllo negativo, è stato impiegato lo stesso vettore *pCMV6-AC-GFP*, ma privo dell'ORF di *CDC73*, e quindi codificante per la sola GFP.

Il plasmide codificante per parafibromina *wild-type* sarà d'ora in avanti designato come wt-CDC73, e quello codificante per la sola GFP sarà denominato GFP.

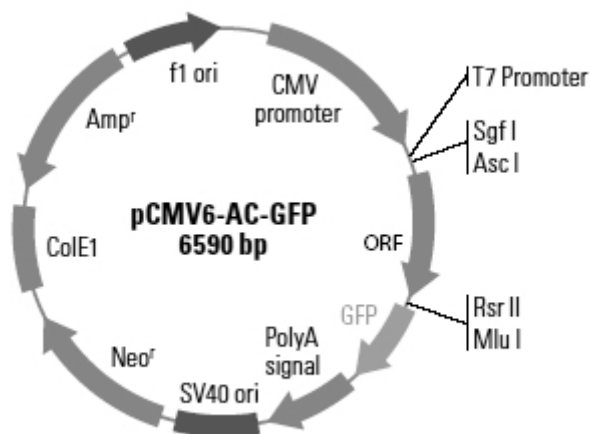


Figura 3.3. Mappa del plasmide *pCMV6-AC-GFP* (da www.origene.com).

3.1.5. Mutagenesi sito-specifica

Attraverso mutagenesi sito specifica, l'ORF di *CDC73* *wild-type* clonata nel plasmide *pCMV6-AC-GFP* è stata mutagenizzata in posizione 179 (secondo la sequenza di riferimento CCDS 1382.1) sostituendo la timina con l'adenina. La mutagenesi è stata realizzata con l'impiego del *QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), utilizzando primers oligonucleotidici sintetici

contenenti la mutazione (tabella 3.2) disegnati attraverso l'utilizzo del programma *QuickChange Primer Design* (www.agilent.com/genomics/gcpd).

Mutazione inserita	Sequenza dei primers oligonucleotidici
T179A	F: AGA GTA CTA CAC ATT GGA TTC CAA TTT ATT TCT ACT TAA TAA CGT GC R: GCA CGT TAT TAA GTA GAA ATA AAT TGG AAT CCA ATG TGT AGT ACT CT

Tabella 3.2. Primers utilizzati nel protocollo di mutagenesi; F: *forward*; R: *reverse*.

Il prodotto di amplificazione mutagenizzato è stato trattato, secondo il protocollo, con l'enzima di restrizione *Dpn I* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) a 37°C per 2 ore, per digerire completamente il DNA originario metilato e selezionare il DNA non metilato di nuova sintesi, contenente la mutazione di interesse (figura 3.4).

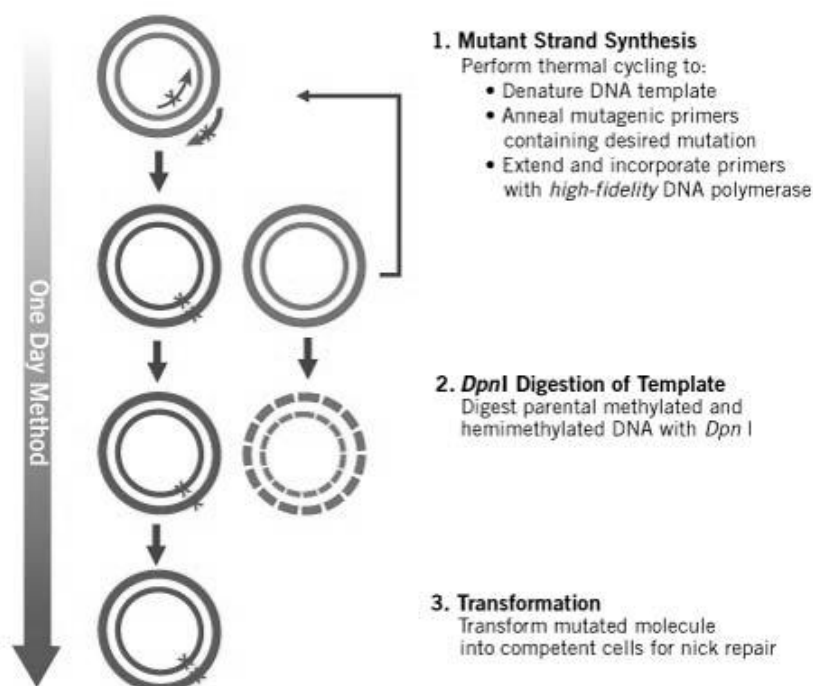


Figura 3.4. Schema delle fasi che costituiscono il processo di mutagenesi sito-specifica impiegato dal protocollo del *QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies)

Il plasmide ottenuto è stato trasformato in *XL-10 Gold Ultracompetent Cells* (Agilent Technologies) che sono state seminate su piastre LB-agar con ampicillina (100 µg/mL) e incubate a 37 °C *overnight*. Dieci delle colonie ottenute sono state incubate in 2 ml di

LB con ampicillina (100 µg/mL) e incubate a 37 °C *overnight*. Successivamente è stata eseguita l'estrazione del DNA plasmidico dalle singole colonie tramite minipreparazione eseguita con l'*High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche Diagnostics), seguendo il protocollo fornito dal produttore.

3.1.6. Amplificazione e sequenziamento dell'inserto

I prodotti delle minipreparazioni sono stati sottoposti a PCR e sequenziamento per verificare che i plasmidi recassero effettivamente l'inserto mutagenizzato. Per l'amplificazione è stata impiegata una coppia di primers che permette l'amplificazione di un segmento di cDNA di *CDC73* comprendente gli esoni da 1 a 7 (*Pimenta et al., 2006*).

La purificazione ed il sequenziamento degli amplificati sono stati condotti come descritto al paragrafo 3.1.2.

3.1.7. Maxipreparazione di DNA plasmidico

Una colonia recante il plasmide con la mutazione di interesse è stata inoculata in 2 ml di LB con ampicillina (100 µg/mL) e incubata a 37 °C *overnight*. Trascorso il tempo di incubazione, il mini-inoculo è stato inoculato in 250 ml di LB - ampicillina e incubato nuovamente a 37°C *overnight*.

Successivamente è stata eseguita l'estrazione del DNA utilizzando il *QIA Filter Plasmid Maxi Kit* (Qiagen); Il plasmide così ottenuto, recante la transversione T>A in posizione 179 nella sequenza della ORF di *CDC73*, verrà d'ora in avanti chiamato Ile60Asn.

3.1.8. Immunofluorescenza e microscopia confocale

Per verificare se la presenza della mutazione Ile60Asn potesse influire sulla localizzazione subcellulare di parafibromina, è stata eseguito un saggio di co-localizzazione tramite immunofluorescenza per un marcatore nucleolare (B23 o nucleofosmina), seguito da osservazione in microscopia confocale. Cellule HEK293A sono state seminate alla densità di 5×10^4 su vetrini da microscopia posti in piastre da 24 pozzetti. Ventiquattro ore dopo, è stata effettuata la trasfezione con i 3 plasmidi GFP, wt-*CDC73* e Ile60Asn utilizzando 1µg di DNA plasmidico per pozzetto e il *Lipofectamine 2000 Transfection Reagent* (Invitrogen-Life Technologies), seguendo le indicazioni del protocollo fornito dal produttore. Quarantotto ore dopo la trasfezione, le cellule sono state fissate in paraformaldeide al 4 %, permeabilizzate in TBS- Triton 0.3% e sottoposte a blocco dei siti aspecifici in TBS-Triton 0.3% - 2% BSA.

Successivamente, le cellule sono state incubate con un anticorpo primario anti B23 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) diluito 1:50 in TBS- Triton 0.3% - 2% BSA, lavate in PBS ed incubate con un anticorpo secondario *AlexaFluor-594 Donkey anti Goat- IgG* (Invitrogen-Life Technologies) diluito 1:200 in TBS- Triton 0.3% con il 2% di BSA. Infine, è stata effettuata la colorazione dei nuclei con il colorante *TOTO-3 Iodide* (Invitrogen-Life Technologies). I vetrini sono stati quindi rimossi dalla piastra e montati su supporti con apposito *mounting medium*.

Le immagini sono state acquisite con un microscopio confocale Leica TCS-NT/SP2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) ad ingrandimento 20X, e successivamente ad ingrandimento 40X, aggiungendo un ulteriore *zoom 2X*.

3.1.9. Western Blot

La tecnica del *western blot* è stata utilizzata per verificare l'espressione di parafibromina (trasfettata ed endogena), ciclina D1 e c-Myc in cellule HEK293A trasfettate con i tre plasmidi wt-CDC73, GFP e Ile60Asn.

Le cellule sono state seminate alla densità di 3×10^5 in piastre da 6 pozzetti 24 ore prima della trasfezione, effettuata come descritto nel paragrafo 3.1.8 e impiegando 5 μ g di DNA plasmidico per pozzetto. Quarantotto ore post-trasfezione, le cellule sono state raccolte e lisate con il *M-PER Extraction Reagent* (Thermo Scientific, MA, USA).

Le proteine totali sono state quantificate con il *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific), attenendosi al protocollo fornito dal produttore per la misurazione in micropiastre. L'assorbanza alla lunghezza d'onda di 492 nm è stata misurata in un lettore di piastre Sunrise (Tecan, Mannedorf, Switzerland).

Cinquanta microgrammi di proteine sono stati caricati su gel di SDS-poliacrilammide al 10% e blottati su membrana in PVDF (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). La membrana è stata sottoposta a blocco dei siti aspecifici in TBS addizionato con Tween20 allo 0,001%- latte scremato in polvere al 5% e successivamente incubata con anticorpi primari anti- parafibromina (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), anti ciclina D1 (Abcam, Cambridge, UK), o anti c-Myc (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Per consentire la normalizzazione del dato di espressione, è stato impiegato un anticorpo diretto contro la β -actina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA). Le caratteristiche degli anticorpi primari utilizzati sono riassunte in Tabella 3.3.

Anticorpo primario	Ditta	Diluzione impiegata	Tempo di incubazione
CDC73 (A264) Rabbit polyclonal antibody to parafibromin	Cell Signaling	1:1000	16 ore (4°C)
Rabbit monoclonal [SP4] to Cyclin D1	Abcam	1:200	2 ore
Rabbit polyclonal to c-Myc (N-262)	Santa Cruz Biotechnology	1:200	16 ore (4°C)
Mouse monoclonal anti β -Actin (clone AC-15)	Sigma-Aldrich	1:5000	1 ora

Tabella 3.3. Anticorpi primari utilizzati nei *Western blot*

Successivamente, sono stati impiegati anticorpi secondari coniugati con HRP (tabella 3.4). Il segnale chemiluminescente è stato rilevato esponendo le membrane per 1 minuto al *LiteAbiot Plus Enhanced Chemiluminescent Substrate* (EuroClone, Milano, Italia), e per l'acquisizione del segnale è stato impiegato uno strumento VersaDoc (Bio-Rad). Per incrementare la sensibilità del segnale relativo a parafibromina, sono invece state impiegate lastre fotografiche BioMax (Kodak, Rochester, NY, USA) che, dopo essere state esposte per 1 minuto alla membrana trattata con il substrato chemiluminescente, sono state sviluppate utilizzando l'*Amersham Hyperprocessor Automatic Film Processor* (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA).

Anticorpo secondario	Ditta	Diluizione impiegata	Tempo di incubazione
Goat polyclonal to Rabbit IgG- H&L (HRP)	Abcam	1:3000	1 ora
Goat polyclonal to mouse IgG- H&L (HRP)	Abcam	1:5000	1 ora

Tabella 3.4. Anticorpi secondari utilizzati nel Western Blot

3.1.10. Saggio di proliferazione cellulare

Per la valutazione della proliferazione cellulare 48 ore dopo la trasfezione è stato impiegato un saggio che valuta l'incorporazione di bromodeossiuridina, che viene rilevata immunochimicamente, nel DNA delle cellule attivamente proliferanti.

Le cellule HEK293A sono state seminate alla densità di 5×10^3 in piastre da 96 pozzetti 24 ore prima della trasfezione, effettuata come precedentemente descritto e impiegando 0,2 μg di DNA plasmidico per pozzetto; per ognuna delle condizioni sperimentali sono stati trasfettati otto pozzetti.

Quarantotto ore dopo la trasfezione, il saggio di proliferazione è stato effettuato utilizzando il *BrdU Cell Proliferation Assay Kit* (Millipore, Billerica, MA, USA) seguendo le indicazioni del produttore. L'assorbanza alla lunghezza d'onda di 450 nm è stata misurata in un lettore di piastre Sunrise (Tecan).

Sono stati eseguiti 4 esperimenti indipendenti e le medie dei risultati sono state comparate mediante *t*-test. Un valore di *P* inferiore a 0.05 è stato considerato significativo.

3.1.11. Studio del ciclo cellulare tramite citofluorimetria a flusso

Per valutare la distribuzione delle cellule trasfettate con i plasmidi wt-CDC73, GFP e Ile60Asn nelle diverse fasi del ciclo cellulare, è stata impiegata la citofluorimetria a flusso. In particolare, è stato utilizzato un approccio che prevede la quantificazione dello ioduro di propidio, sostanza che si intercala nel DNA cellulare.

Le cellule HEK293A sono state seminate alla densità di 3×10^5 in piastre da 6 pozzetti 24 ore prima della trasfezione con i 3 plasmidi di interesse, effettuata come precedentemente descritto. Quarantotto ore dopo la trasfezione, le cellule sono state fissate e permeabilizzate in etanolo al 70% e risospese in 500 μl di buffer citrato contenente 10 μl di ioduro di propidio (1 mg/ml) e 50 μl di RNAsi (1 mg/ml). Dopo un incubazione a 37° C per 30 minuti, le cellule sono state trattate con il colorante vitale Calcein Violet 450 AM (eBioscience Inc., CA, USA) a concentrazione finale 10 μM per 30 minuti a temperatura ambiente. L'incorporazione di ioduro di propidio e del colorante vitale è stata misurata utilizzando un citofluorimetro a flusso BD LSR II (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), e i dati ottenuti sono stati analizzati con il software *FlowJo* (Treestar, Ashland, OR, USA). Le medie dei risultati di 3 esperimenti indipendenti sono state confrontate con il *t*-test, e un valore di *P* <0.05 è stato considerato significativo.

3.1.12. Studio dell'induzione di apoptosi tramite citofluorimetria a flusso

Per valutare il livello di apoptosi nelle cellule trasfettate è stata utilizzata la citofluorimetria a flusso, impiegando un saggio che valuta l'incorporazione di Annessina V marcata con un fluorocromo; il segnale risultante è proporzionale alla quantità di fosfatidilserina, fosfolipide che viene esposto sul foglietto esterno della membrana plasmatica negli stadi iniziali dell'apoptosi.

Le cellule HEK293A sono state seminate alla densità di 3×10^5 in piastre da 6 pozzetti 24 ore prima della trasfezione, effettuata come precedentemente descritto; è stato inoltre stabilito un controllo positivo trattando un pozzetto con etoposide (EbewePharma-Sandoz, Holzkirchen, Germany) a concentrazione 50 μ M.

Quarantotto ore dopo la trasfezione ed il trattamento con etoposide, le cellule sono state raccolte, contate e lavate in PBS. Centomila cellule sono state infine risospese in *Annexin Binding Buffer* 1X e incubate con 5 μ l di Annessina-V coniugata APC (BD Biosciences) e 5 μ l di ioduro di propidio (1 mg/ml), per 15 minuti al buio a temperatura ambiente. L'analisi citofluorimetrica e l'elaborazione dei dati sono state condotte come descritto nel paragrafo precedente.

Sono state considerate apoptotiche sia le cellule positive per la sola Annessina V-APC (apoptosi precoce), che quelle positive per Annessina V-APC e ioduro di propidio (apoptosi tardiva). Le medie dei risultati di 3 esperimenti indipendenti sono state confrontate con il *t*-test, e un valore di $P < 0.05$ è stato considerato significativo.

3.2. Studio del profilo di espressione di miRNA in tumori paratiroidei sporadici con miRNA-microarrays

3.2.1. Tumori paratiroidei sporadici analizzati

Lo studio del profilo di espressione dei miRNA in tumori paratiroidei sporadici è stato effettuato sulle neoplasie di un totale di 11 pazienti (8 femmine e 3 maschi, età mediana 64 anni, range 16-77 anni), comprendenti tre carcinomi ed otto adenomi paratiroidei (Tabella 3.5). Uno dei carcinomi (PC2) presentava una mutazione somatica nonsense in eterozigosi, ovvero Glu29X.

Ogni campione è stato suddiviso in due parti, ognuna delle quali è stata trattata come un campione indipendente.

Campione	Sesso	Età (anni)	Presenza di mutazioni somatiche di <i>CDC73</i>
PC1	F	75	NO
PC2	F	32	Glu29X
PC3	F	73	NO
PA1	F	60	NO
PA2	F	74	NO
PA3	F	77	NO
PA4	F	64	NO
PA5	M	59	NO
PA6	F	57	NO
PA7	M	16	NO
PA8	M	72	NO

Tabella 3.5. Tumori paratiroidi sporadici studiati con miRNA-microarrays; PC: carcinoma paratiroideo; PA: adenoma paratiroideo

3.2.2. Estrazione di RNA da tessuto congelato ed analisi dell'espressione di miRNA con miRNA- microarrays

L'RNA totale, comprendente anche la frazione dei miRNA, è stato isolato dai tessuti congelati dei tumori paratiroidi impiegando il *MirVANA* kit (Ambion-Life Technologies) seguendo il protocollo fornito dal produttore. La qualità dell'RNA totale estratto è stata valutata utilizzando lo strumento Agilent 2100 Bioanalyzer con l'Agilent RNA 6000 Pico Kit (Agilent Technologies).

La marcatura e l'ibridazione dell'RNA sono state effettuate con Human miRNA V3 Microarray Kit su vetrini Human Microarrays Rel. 12.0 (Agilent Technologies), che rappresentano un totale di 866 miRNA umani e 89 miRNA virali, la cui sequenza è stata ricavata dalla versione 12.0 del Sanger-miRBase. La scansione degli arrays è stata eseguita utilizzando il Microarray Scanner (Agilent Technologies).

3.2.3. Pre-processing dei dati e Significance Analysis of Microarrays (SAM)

L'analisi statistica dei dati ottenuti con i miRNA-microarrays è stata effettuata in collaborazione con il DEI (Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione) dell'Università degli Studi di Padova. L'analisi effettuata ha previsto una prima fase di processamento dei dati grezzi, ovvero una valutazione della qualità dei dati (sottrazione del background, normalizzazione e ricerca degli *outliers*), e successivamente l'analisi volta ad individuare i miRNA espressi differenzialmente tra adenomi e carcinomi paratiroidi.

Il processamento dei dati è stato effettuato con il software *Feature Extraction* (Agilent Technologies), il quale, per estrarre i dati grezzi di intensità del segnale e del background, effettua automaticamente funzioni quali *gridding*, *segmentation* (che

definisce i pixel appartenenti al *foreground* e quelli appartenenti al *background*) e l'estrazione dell'intensità del segnale. Inoltre, il software fornisce automaticamente anche una valutazione qualitativa del microarray, il *QC-report*, che riporta la distribuzione spaziale degli *outliers*, la presenza di eventuali gradienti di intensità del segnale, lo stato dei controlli negativi, la qualità delle repliche interne e la riproducibilità delle repliche.

Sono inoltre riportati nel QC-report:

- *Mean Signal*: è il segnale "grezzo" dello spot ricavato dalle intensità dei pixel "inlier";
- *Processed Signal*: è il segnale ottenuto dall'algoritmo di Feature Extraction ripulito dal segnale di background;
- *Total Probe Signal*: è la media dei processed signals di ogni probe replicata;
- *Total Gene Signal*: è la somma dei total probe signals per ogni gene.

È stata determinata, inoltre, l'intensità relativa di ogni spot dell'array rispetto alla mediana dei valori del medesimo spot su tutti gli array analizzati (*Relative Log Expression*). Infine, per i segnali considerati sono stati creati gli *MvA plot*, i quali consentono di visualizzare, per ogni array del *dataset*, la differenza tra i valori di intensità degli spot nell'array osservato e il corrispondente valore mediano calcolato su tutti gli array (in ordinata) contro la media tra i valori dell'array e il valore mediano (in ascissa). Se si assume che la maggior parte degli spot corrispondano a geni non differenzialmente espressi, non dovrebbero risultare variazioni evidenti tra l'array osservato e l'array "mediano", e quindi la nuvola di punti dovrebbe essere attorno a $M=0$.

Per la normalizzazione dei dati è stata utilizzata la funzione *loess*: questo metodo si basa sui valori calcolati per gli *MvA plot* (media e differenza), e permette di ottenere una curva che approssimi al meglio la non linearità legata ad eventuali trend presenti nel plot.

Si è proceduto quindi con l'analisi dei dati secondo il metodo SAM (*Significance Analysis of Microarrays*), che assegna ad ogni gene (o, in questo caso, miRNA) un valore sulla base della variazione nella sua espressione relativa alla deviazione standard di misurazioni ripetute. Per i miRNA con valori superiori ad un definito livello soglia, la SAM impiega delle permutazioni delle misurazioni ripetute per stimare la percentuale di geni che può essere identificata per effetto del caso, il *false discovery rate* (FDR) (*Tusher et al., 2001*).

3.2.4. Gene set enrichment analysis (GSEA)

Ai dati di espressione dei miRNA è stata quindi applicata un'analisi denominata *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) descritta da Subramanian e collaboratori (Subramanian *et al.*, 2005), ideata per studiare se un dato set S di geni, definito a priori, mostra differenze statisticamente significative tra due condizioni biologiche esaminate. L'obiettivo di tale analisi è testare quanto è significativa la distribuzione di elementi appartenenti ad un set S (nel nostro caso, miRNA con target in determinate *pathways* cellulari) su una lista ordinata di dati (L): nel nostro caso, questa è la lista di tutti i miRNA analizzati con i livelli di espressione sui due fenotipi (adenomi e carcinomi), ordinata secondo una statistica come il t -test.

Un concetto fondamentale della GSEA è l'*enrichment score* (ES), che riflette il grado in cui S è iper-rappresentato agli estremi (all'inizio o alla fine) della lista L . Lo score è calcolato percorrendo la lista di geni e creando una statistica *running-sum* il cui valore aumenta quando si incontra un gene del set S , e diminuisce quando si incontra un gene che non fa parte di S . L'ampiezza dell'incremento dipende dalla correlazione del gene con il fenotipo. L'ES è la massima deviazione dallo zero incontrata nel percorrere la lista rispetto ad una distribuzione casuale dei geni del set S . Viene quindi stimata la significatività statistica dell'ES usando un test di permutazione basato sulla classificazione fenotipica del data set (adenoma *vs.* carcinoma nel nostro caso).

Un altro concetto chiave dell'analisi è quello di *leading edge subset*. In alcuni casi, è infatti utile evidenziare i membri principali del set S che contribuiscono all'ES. Il *leading edge subset* rappresenta quei geni di S che appaiono nella lista L prima del raggiungimento o al punto della massima deviazione da zero, e può essere interpretato come il "cuore" di un set genico responsabile dell'*enrichment* (Figura 3.5).

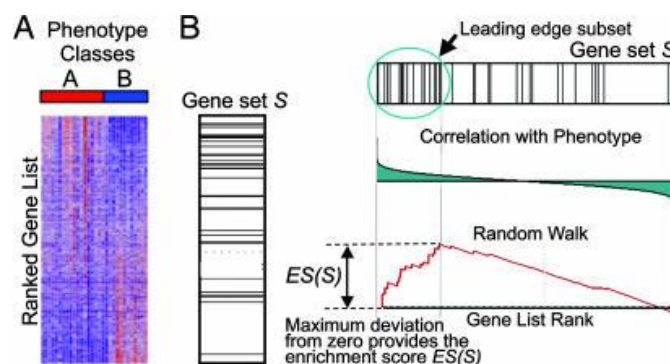


Figura 3.5. Schema degli aspetti principali della GSEA (da Subramanian *et al.*, 2005)

Le pathways sono state scelte dalla sezione “*Validated pathway targets*” del database miRWalk (<http://www.ma.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/pathwaytarget.html>) (Dweep et al., 2011), che riporta informazioni riguardo ad interazioni miRNA-targets nell’ambito di un elenco di vie metaboliche e di segnalazione intracellulare estratte da database quali KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, <http://www.genome.jp/kegg/>) e BioCarta (<http://www.biocarta.com>). In particolare, sono state selezionate le seguenti 35 pathways cellulari di interesse:

- Adherens junctions
- AGPCR pathway
- AKT pathway
- Apoptosis
- BAD pathway
- Basal transcription factors
- Calcium signaling pathway
- Cell adhesion molecules
- Cell cycle
- EGF pathway
- ERBB signalling pathway
- ERK pathway
- Focal adhesion
- Gap junction
- GSK3 pathway
- HDAC pathway
- Hedgehog signalling pathway
- Integrin pathway
- JAK-STAT signalling pathway
- MAPK pathway
- MET pathway
- NFkB pathway
- NOTCH pathway
- P53 pathway
- PDGF pathway
- PKC pathway
- PTEN pathway
- RAS pathway
- RB pathway
- Regulation of actin cytoskeleton
- RNA polymerase
- SHH pathway
- Tight junctions
- VEGF pathway
- WNT pathway

3.2.5. Criteri di selezione di miR-9 per studi in vitro

Una volta identificate le *pathways* differenzialmente espresse tra adenomi e carcinomi paratiroidi, la scelta di un miRNA (miR-9) per ulteriori approfondimenti *in vitro* è stata effettuata sia sulla base di dati presenti in letteratura che attraverso la consultazione del software miRWALK, per individuare possibil target di interesse da validare sperimentalmente.

3.2.6. Real Time-RT PCR per miR-9

Nei tumori paratiroidi sottoposti a miRNA-*profiling*, il livello di espressione di miR-9 è stato misurato tramite real time-RT PCR. L'espressione di miR-9 è stata valutata in rapporto a quella di un miRNA comunemente utilizzato come normalizzatore, ovvero RNU6B. Il metodo utilizzato si è basato sull'impiego del kit *TaqMan® microRNA assay* (Applied Biosystems-Life Technologies), che prevede una fase di retrotrascrizione del singolo miRNA con specifici primers ed una successiva fase di amplificazione del retrotrascritto in presenza di sonde *TaqMan* MGB. Lo strumento utilizzato per le reazioni di Real Time PCR è il *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems-Life Technologies). La quantificazione del miRNA è stata effettuata sui dati di real-time RT-PCR secondo il metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizzando come riferimento per la normalizzazione la mediana del valore di ΔC_t di tutti i campioni.

3.2.7. Clonaggio e produzione del plasmide pmirGLO-CDC73

La sequenza 3' UTR di *CDC73*, target predetto di mir-9, è stata clonata nel pmirGLO Dual Luciferase miRNA Target Expression Vector (Promega) (Figura 3.6).

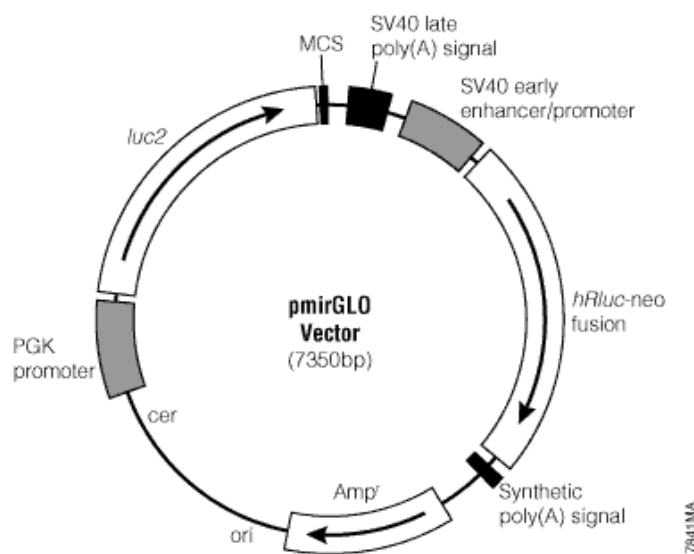


Figura 3.6. Schema del plasmide pmirGLO (Promega)

Questo plasmide permette di valutare l'attività del miRNA tramite l'inserimento della sequenza 3'-UTR del potenziale gene target a valle del gene *reporter luc2* (che codifica per la luciferasi di lucciola) e di normalizzare l'analisi grazie alla presenza del gene *hRluc*, codificante per la luciferasi di Renilla.

I primers per l'amplificazione dell'UTR 3' di *CDC73* sono stati disegnati con Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>); alle estremità 5' di ciascun primer sono stati inseriti siti di taglio per gli enzimi di restrizione *SacI* e *XhoI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), per consentire il clonaggio dell'amplificato nel plasmide. In particolare, 400 ng di amplificato sono stati clonati in 50 ng di plasmide pmirGLO utilizzando l'enzima *T4 DNA Ligase* (New England Biolabs). Al termine della ligazione, il plasmide è stato trasformato in cellule competenti *OneShot Top10* (Invitrogen-Life Technologies) tramite shock termico, seguendo il protocollo fornito dal produttore. I batteri trasformati sono stati seminati su terreno LB Agar addizionato con 100µg/ml di ampicillina e incubati *overnight* a 37°C.. Il giorno dopo sono state selezionate 12 colonie isolate che sono state poste in coltura in LB (100µg/ml di ampicillina) per la successiva minipreparazione di DNA plasmidico, che è stata effettuata con il *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche Diagnostics) seguendo le indicazioni del produttore. Infine sono state eseguita la restrizione di 1 µg di plasmide e successiva corsa elettroforetica su gel di agarosio per verificare la corretta trasformazione, e quindi l'avvenuto clonaggio. A partire dalle colonie positive e correttamente trasformate, è stata eseguita la maxipreparazione del plasmide pmirGLO-*CDC73* impiegando il *QIA Filter Plasmid Maxi Kit* (Qiagen).

3.2.8. Saggio dell'attività luciferasica per la valutazione dell'attività di miR-9

Il clonaggio della sequenza 3' UTR dei potenziali geni target all'estremità 3' del gene della luciferasi nel vettore pmirGLO permette di valutare qualitativamente e quantitativamente l'attività di un miRNA. La luciferasi *luc2* è un gene reporter: la riduzione dell'emissione luminosa indica il legame del miRNA esogeno alla sequenza target clonata nel plasmide, che riduce quindi l'espressione della luciferasi.

Il saggio della luciferasi è stato effettuato in cellule HEK-293A. Le cellule sono state seminate alla densità di 5×10^3 cellule/pozzetto in piastra da 96 pozzetti il giorno precedente la trasfezione. Le cellule sono state trasfettate con 400 ng di plasmide (pmirGLO vuoto o pmirGLO-*CDC73*) per pozzetto e 3 pmol di precursore di miR-9 o miR Negative Control (Applied Biosystems-Life Technologies). La trasfezione è stata effettuata impiegando il reagente *Lipofectamine 2000* (Invitrogen-Life Technologies).

Quarantotto ore dopo la trasfezione, è stato effettuato il saggio dell'attività luciferasica con il kit *Dual-Glo Luciferase Assay System* (Promega), seguendo il protocollo fornito dal produttore. La lettura della luminescenza delle due luciferasi è stata quindi effettuata utilizzando un luminometro Victor 2 (PerkinElmer, Norwalk, CT, USA). I valori di intensità dell'emissione luminosa della prima luciferasi, *luc2*, sono stati normalizzati su quelli della seconda, e successivamente confrontati con il test *t-Student*. Un valore di *P* pari a 0.05 è stato considerato significativo.

3.2.9. Analisi dell'espressione di parafibromina e ciclina D1 tramite western blot

Per valutare l'espressione di parafibromina e ciclina D1 48 ore dopo la trasfezione con il precursore di miR-9, cellule HEK293A sono state seminate in piastre da 6 pozzetti alla densità di 3×10^5 24 ore prima della trasfezione con 50, 100 or 200 pmol di precursore di miR-9 o miR-Negative Control. Quarantotto ore dopo la trasfezione, le cellule sono state raccolte e lisate e sono state quantificate le proteine totali (si veda il paragrafo 3.1.9). Il *western blot* per parafibromina e ciclina D1 è stato eseguito come descritto nel paragrafo 3.1.9.

3.2.10. Immunoistochimica per parafibromina e ciclina D1 su sezioni di tumori paratiroidi sporadici

E' stato effettuato, tramite immunoistochimica, uno studio dell'espressione di parafibromina e ciclina D1 nei tessuti dei tumori paratiroidi sporadici studiati anche con miRNA-microarrays. A tale scopo sono state impiegate delle sezioni di tessuto fissate in formalina al 10% per 48-72 ore ed incluse in paraffina. Tali sezioni sono state idratate utilizzando concentrazioni decrescenti di etanolo, lavate in acqua deionizzata e sottoposte a smascheramento antigenico con sodio citrato 10mM a pH 6.0, a 96°C per 30 minuti. I campioni sono stati successivamente trattati con perossido di idrogeno allo 0.3 % per rimuovere l'attività perossidasi endogena, e con BSA per il blocco dei siti di legame aspecifici.

Le sezioni sono state infine incubate con gli anticorpi anti-parafibromina (SC-33638, Santa Cruz Biotechnology Inc.) o anti- ciclina D1 (Rabbit monoclonal [SP4] to Cyclin D1, Abcam).

Dopo lavaggio in PBS, le sezioni sono state incubate con siero anti-*mouse* (parafibromina) o anti-*rabbit* (ciclina D1) (Universal Immuno-peroxidase Polymer,

Histofine, Japan), sviluppate in 3,3'-diaminobenzidina (Sigma-Aldrich) e controcolorate con ematossilina.

Le reazioni immunohistochimiche sono state valutate osservando dapprima i campioni a basso ingrandimento (5X) e successivamente ad ingrandimenti maggiori (10X, 20X, 40X) in microscopia ottica. La valutazione ha considerato il numero di cellule con positività nucleare per parafibromina o ciclina D1.

CAPITOLO 4

RISULTATI

4.1. Studio funzionale di una nuova mutazione missenso nella regione N-terminale di parafibromina

4.1.1. Identificazione di una mutazione di singolo nucleotide nel gene *CDC73* in un fibroma ossificante mandibolare

La ricerca di mutazioni nella regione codificante e nelle giunzioni esone-introne del gene *CDC73* in DNA estratto dal tessuto tumorale del fibroma ossificante della paziente IV-1 (figura 4.1), effettuata tramite sequenziamento diretto, ha portato all'identificazione di una alterazione somatica in eterozigosi, ovvero una transversione T>A in posizione 179, che può essere descritta come c.179 T>A.

La presenza dell'alterazione è stata confermata eseguendo una seconda indipendente reazione di amplificazione dell'esone 2 di *CDC73* seguita da sequenziamento.

A livello proteico, l'alterazione individuata comporta, in parafibromina, la sostituzione dell'amminoacido Isoleucina con una Asparagina in posizione 60.

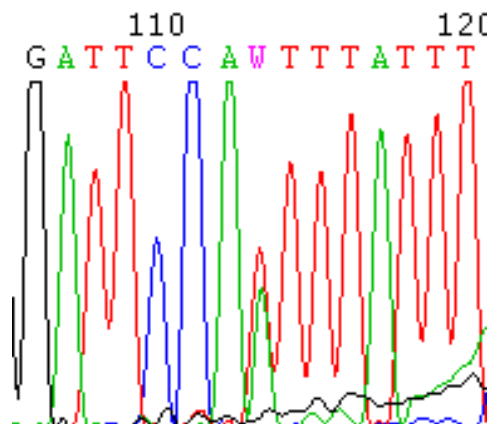


Figura 4.1. Identificazione della mutazione puntiforme in eterozigosi c.179T>A di *CDC73*

4.1.2. Predizione della potenziale patogenicità della mutazione *Ile60Asn* di *CDC73*

La consultazione del software MutationTaster (www.mutationtaster.org) ha consentito di determinare, per l'alterazione di interesse, una predisposizione alla patogenicità (ovvero di essere “*disease causing*”) pari al 99% circa (Figura 4.2).

Prediction: disease causing**Model: *simple_aae*, p
(probability):
0.999731361963278**

Figura 4.2. Predizione delle patogenicità della mutazione puntiforme c.179T>A , così come viene individuata dal software MutationTaster.

Inoltre, tramite lo stesso software, è stato possibile effettuare un allineamento di parafibromina umana, normale o mutata, con le sequenze amminoacidiche ortologhe di 10 specie (figura 4.3). Questa analisi ha consentito di valutare lo stato di conservazione nelle diverse specie dell'amminoacido isoleucina in posizione 60 nella proteina: il residuo è risultato essere altamente conservato nelle sequenze ortologhe, essendo identico nella maggior parte delle specie analizzate. In *C. elegans* e *D. melanogaster*, il residuo in posizione 60 è comunque una leucina, amminoacido con caratteristiche molto simili a quelle dell'isoleucina presente nella sequenza umana normale.

species	match	gene	aa	alignment
Human			60	G Q P R E Y Y T L D S I L F L L N N V H L S H P
mutated	not conserve d		60	G Q P R E Y Y T L D S N L F L L N N V H L S H
Chimp	all identical	<u>ENSPTRG0000</u> <u>0001796</u>	60	G Q P R E Y Y T L D S I L F L L N N V H L S H
Rhesus	all identical	<u>ENSMMUG000</u> <u>00022647</u>	60	G Q P R E Y Y T L D S I L F L L N N V H L S H
Cat	all identical	<u>ENSFCAG0000</u> <u>0000348</u>	60	G Q P R E Y Y T L D S I L F L L N N V H L S H
Mouse	all identical	<u>ENSMUSG0000</u> <u>0026361</u>	60	G Q P R E Y Y T L D S I L F L L N N V H L S H
Chicken	all identical	<u>ENSGALG0000</u> <u>0002469</u>	60	G Q P R E Y Y T L D S I L F L L N N V H L S H
Xenopus	all identical	<u>ENSXETG0000</u> <u>0004533</u>	60	G Q P R E Y Y T L D S I L F L L N N V H L S H
Zebrafish	no alignment	<u>ENSDARG0000</u> <u>0020201</u>	n/a	
Fugu	all identical	<u>ENSTRUG0000</u> <u>0009352</u>	60	G Q P K E Y Y T L D S I L F L L N N V H L P H
Elegans	all conserve d	<u>F35F11.1</u>	64	- - - - F Y S L E S I V V F L K
Drosophila	all conserve d	<u>FBgn0037657</u>	60	G A P R E Y Y T L E C I L Y L L K N V M L Q H

Figura 4.3. Allineamento di parafibromina umana *wild-type* e mutata in posizione 60 con le corrispondenti 10 proteine ortologhe di altri organismi

4.1.3. La mutazione Ile60Asn può rappresentare il “secondo hit” di CDC73 in un tumore mandibolare associato a HPT-JT

Il subclonaggio delle sequenze dell'esone 2 amplificate dal DNA estratto dal tessuto tumorale della paziente ha dimostrato che le due mutazioni c.(136_144)del5 e c.179T>A sono su due alleli diversi (figura 4.4), in accordo con l'ipotesi “two-hit” di Knudson riguardo ai geni oncosoppressori.

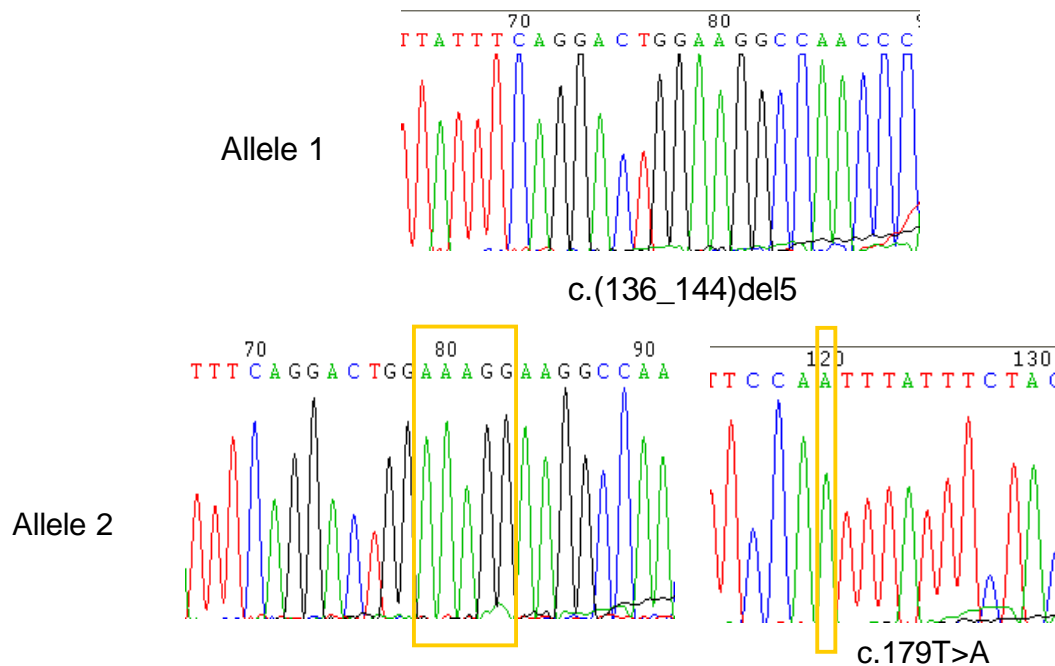


Figura 4.4. Separazione degli alleli dopo subclonaggio: la mutazione germinale c.(136_144)del5 e la mutazione somatica c.179T>A sono su alleli diversi

4.1.4. Parafibromina mutata Ile60Asn è priva di localizzazione nucleolare e risulta meno espressa della wild-type

Lo studio è stato condotto confrontando la localizzazione subcellulare di parafibromina mutata Ile60Asn con quella di parafibromina *wild-type*, entrambe clonate *in frame* con GFP, e della sola GFP in cellule HEK293A trasfettate, rispettivamente, con i plasmidi GFP, wt-CDC73 e Ile60Asn.

La localizzazione del segnale fluorescente verde dovuto all'espressione della GFP è stato confrontato con quella del colorante Toto-3, per individuare la localizzazione subcellulare di parafibromina *wild-type* e mutata.

Lo studio ha evidenziato che GFP da sola è distribuita omogeneamente in tutto il citoplasma e il nucleo delle cellule trasfettate, mentre parafibromina *wild-type* è localizzata a livello del nucleo cellulare, e in particolare risulta più concentrata a livello nucleolare. Parafibromina mutata mantiene la localizzazione a livello nucleare; tuttavia,

l'immunofluorescenza per il marcatore nucleolare B23 (nucleofosmina), seguita dall'osservazione in microscopia confocale ad alto ingrandimento, ha dimostrato che parafibromina Ile60Asn perde la localizzazione nucleolare (Figura 4.5).

Inoltre, la proteina mutata è espressa a livello inferiore rispetto a parafibromina *wild-type*, come risulta dall'evidente decremento nell'intensità del segnale fluorescente (Figura 4.6).

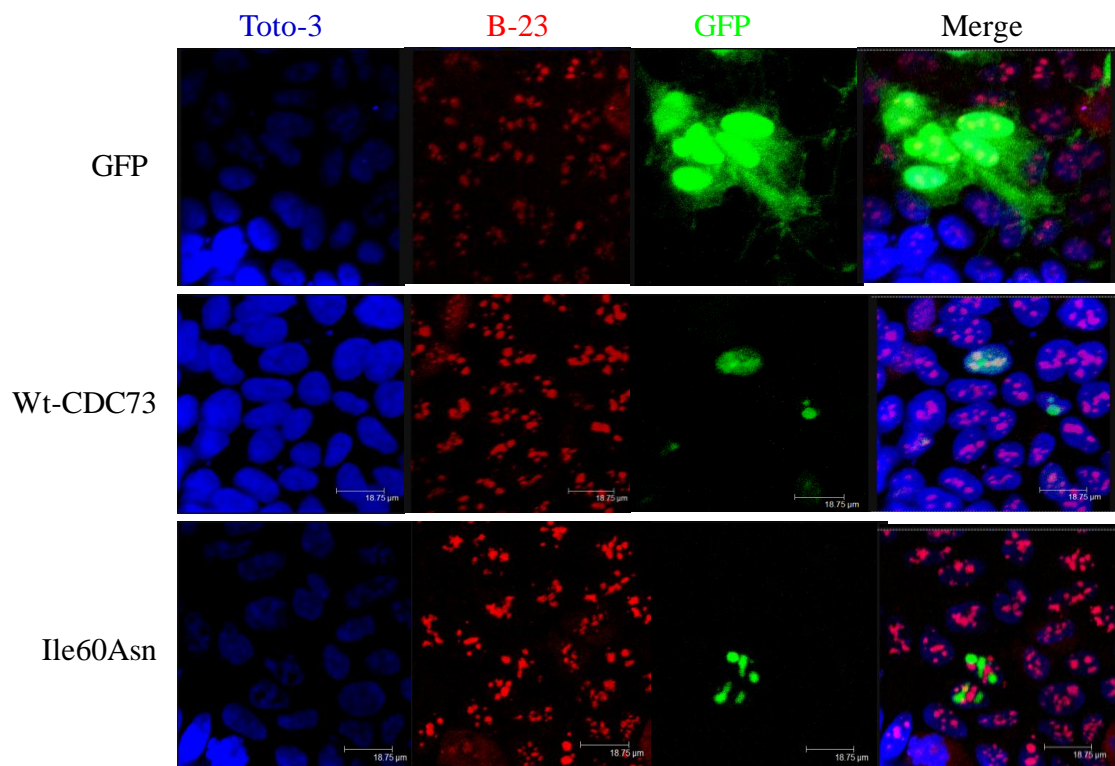


Figura 4.5. Microscopia confocale su cellule HEK293A trasfettate con i plasmidi GFP, wt-CDC73 e Ile60Asn. I nuclei cellulari sono stati colorati con Toto-3 e i nucleoli sono evidenziati tramite immunofluorescenza per la proteina nucleolare B23.

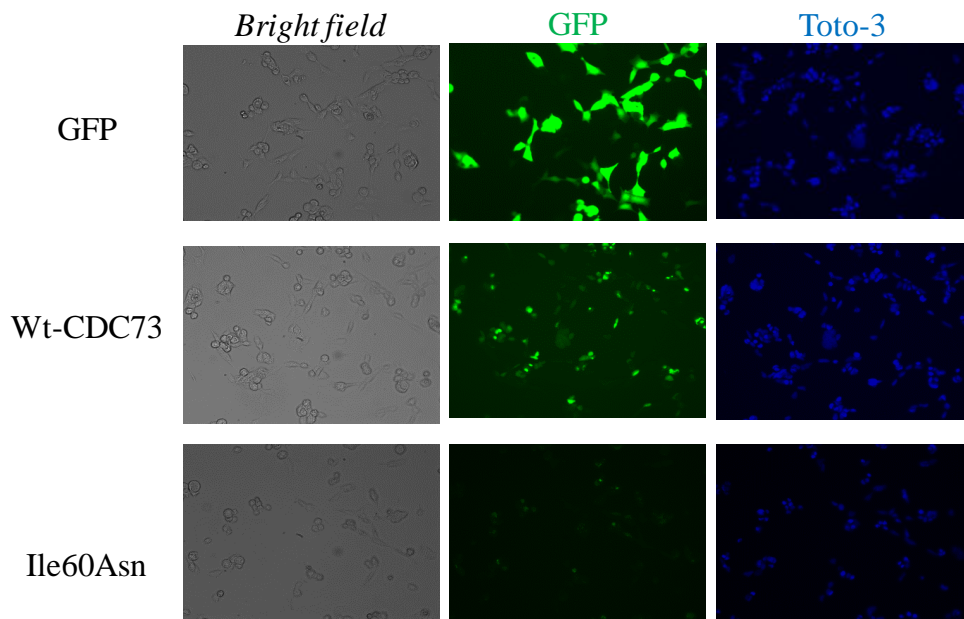


Figura 4.6. Microscopia a fluorescenza (20X) su cellule HEK293A trasfettate con i plasmidi GFP, Wt-CDC73 e Ile60Asn. I nuclei cellulari sono stati colorati con Toto-3

4.1.5. Ridotta espressione di parafibromina mutata Ile60Asn

L'analisi del livello di espressione di parafibromina endogena e trasfettata in cellule HEK293A, effettuata tramite *western blot*, ha confermato che l'espressione della forma mutata Ile60Asn di parafibromina è nettamente inferiore a quella della corrispondente proteina normale. Anche il livello di parafibromina endogena sembra essere più elevato nelle cellule trasfettate con la proteina *wild-type* che in quelle trasfettate con la proteina mutata o con il vettore di controllo (Figura 4.7).

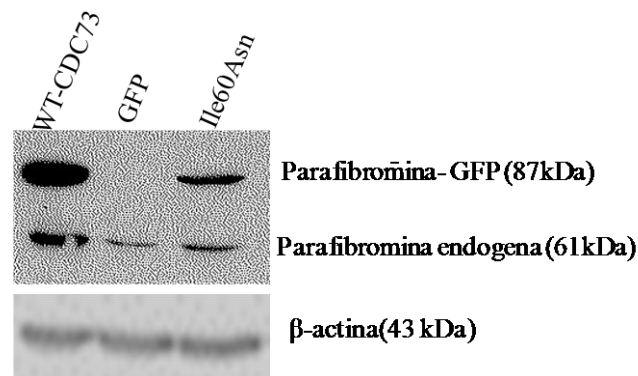


Figura 4.7. *Western blot* per parafibromina in cellule trasfettate con i vettori wt-CDC73, GFP e Ile60Asn

4.1.6. Parafibromina mutata Ile60Asn non è in grado di ridurre l'espressione di ciclina D1

Lo studio del livello di espressione di ciclina D1 e c-Myc, proteine la cui trascrizione è regolata negativamente da parafibromina, è stato effettuato tramite *western blot* in cellule HEK293A 48 ore dopo la trasfezione con parafibromina *wild-type* o Ile60Asn.

Nelle cellule trasfettate con la forma *wild-type* di parafibromina, è stata riscontrata una lieve riduzione dell'espressione di ciclina D1, che non era presente nelle cellule trasfettate con il mutante Ile60Asn o con il vettore di controllo (Figura 4.8).

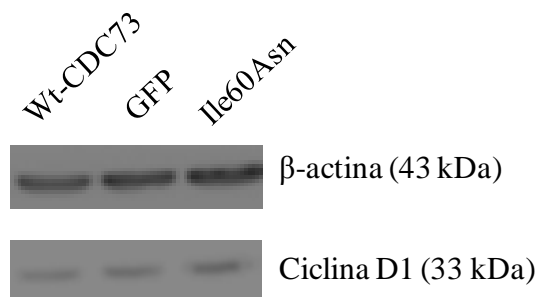


Figura 4.8. *Western blot* per ciclina D1 in cellule trasfettate con i vettori Wt-CDC73, GFP e Ile60Asn

Per quanto concerne l'espressione di c-Myc, al contrario, non sono state osservate significative variazioni tra le cellule trasfettate con la forma *wild-type* di parafibromina e quelle trasfettate con la proteina mutata o con il vettore di controllo (Figura 4.9).

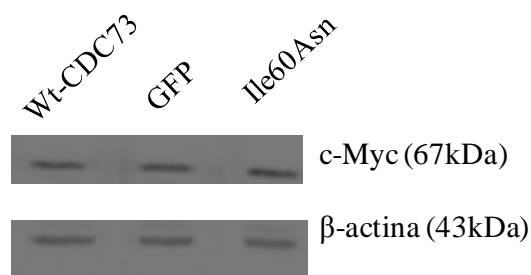


Figura 4.9. *Western blot* per c-Myc in cellule trasfettate con i vettori wt-CDC73, GFP e Ile60Asn

4.1.7. La valutazione della proliferazione cellulare tramite BrdU-assay non rileva differenze significative tra cellule trasfettate con parafibromina wild-type e mutata

Allo scopo di valutare possibili effetti della mutazione Ile60Asn di parafibromina sulla proliferazione cellulare, è stato condotto un saggio basato sull'incorporazione di bromodeossiridina in cellule attivamente proliferanti. Quarantotto ore dopo la trasfezione in cellule HEK293A, non sono state osservate significative variazioni nella proliferazione cellulare tra le cellule trasfettate con il mutante Ile60Asn rispetto alle cellule esprimenti parafibromina *wild-type* o la sola GFP ($P > 0.05$) (Figura 4.10).

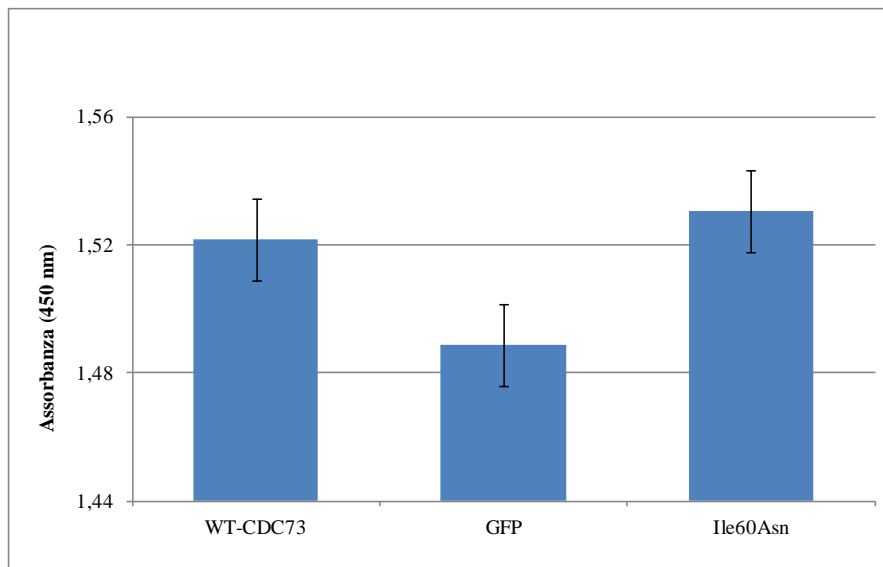


Figura 4.10. Risultato del saggio di proliferazione con BrdU condotto in cellule HEK-293A 48 ore post-trasfezione (medie di 4 esperimenti indipendenti)

4.1.8. La valutazione del ciclo cellulare con citofluorimetria a flusso evidenzia un effetto del mutante Ile60Asn nella progressione nel ciclo cellulare

Oltre al saggio di proliferazione cellulare con bromodeossipuridina, è stato eseguito anche lo studio della distribuzione nel ciclo cellulare delle cellule HEK293A quarantotto ore dopo la trasfezione con i plasmidi GFP, wt-CDC73 o Ile60Asn. Questo tipo di analisi, effettuata con la citofluorimetria a flusso, ha evidenziato una significativa diminuzione della fase G1 ed un significativo aumento delle fasi G2-M nelle cellule trasfettate con il mutante Ile60Asn di parafibromina rispetto alle cellule trasfettate con il plasmide GFP di controllo (Figure 4.11 e 4.12). Le cellule trasfettate con parafibromina wild-type, invece, non presentavano variazioni significative rispetto al controllo.

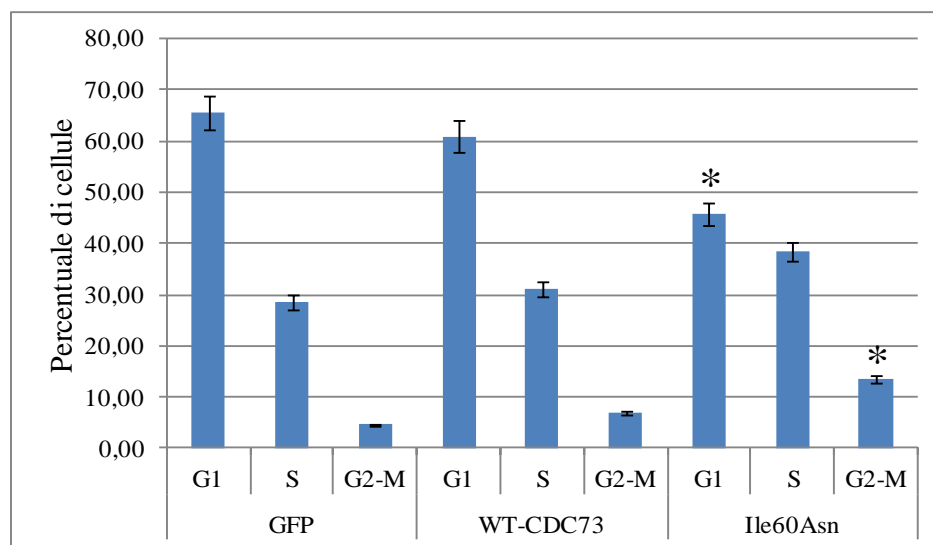


Figura 4.11. Analisi del ciclo cellulare in citofluorimetria a flusso in cellule HEK293A trasfettate con i plasmidi GFP, wt-CDC73 e Ile60Asn (medie di 3 esperimenti indipendenti); *: $P < 0.05$.

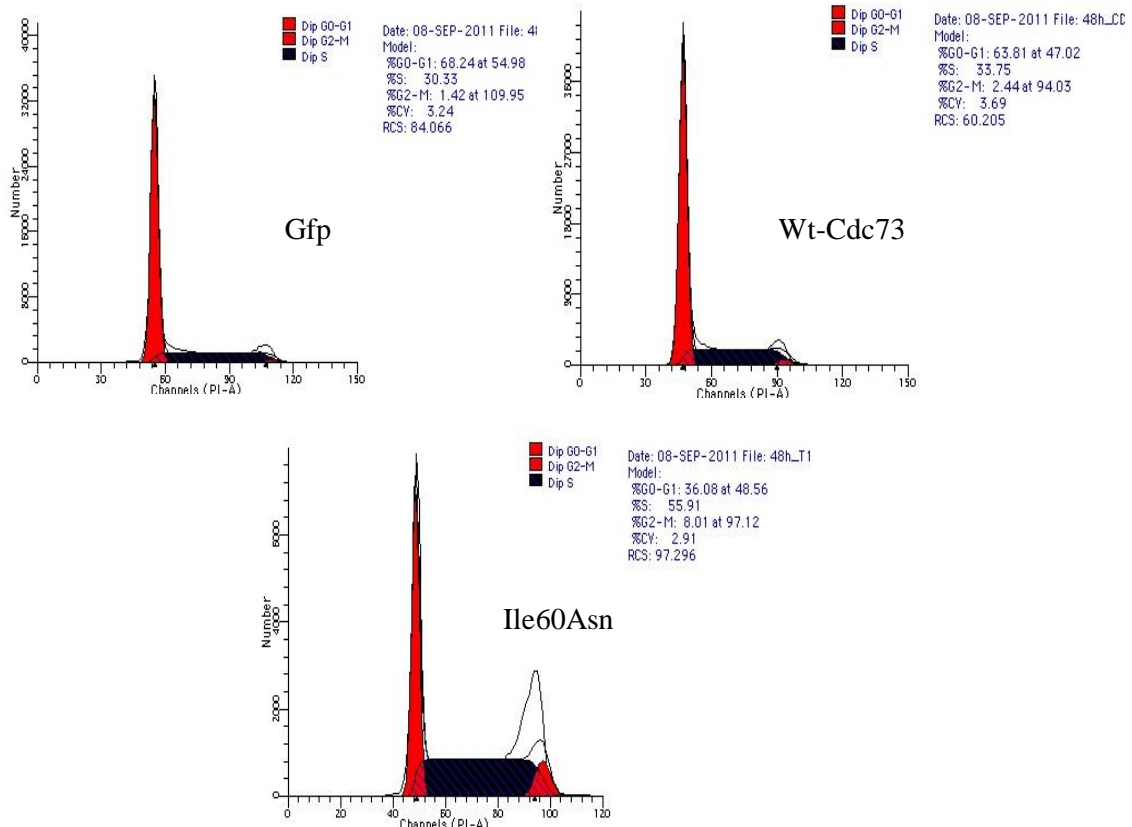


Figura 4.12. Esempio di risultato di analisi del ciclo cellulare effettuata tramite citofluorimetria a flusso. In ordinata è rappresentato il numero di cellule, mentre in ascissa l'intensità del segnale dato dall'incorporazione di ioduro di propidio nel DNA cellulare.

4.1.9. Il mutante *Ile60asn* non induce variazioni nell'apoptosi basale di cellule HEK293A

Per valutare se la presenza della mutazione *Ile60Asn* di parafibromina potesse modificare il livello di apoptosi basale in cellule HEK293A, le cellule sono state raccolte 48 ore dopo la trasfezione e sottoposte ad analisi citofluorimetrica dell'incorporazione di Annessina V - APC e di ioduro di propidio. Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative nell'induzione di apoptosi tra cellule trasfettate con il mutante *Ile60Asn* e cellule trasfettate con parafibromina *wild-type* o con il solo vettore di controllo (Figure 4.13 e 4.14).

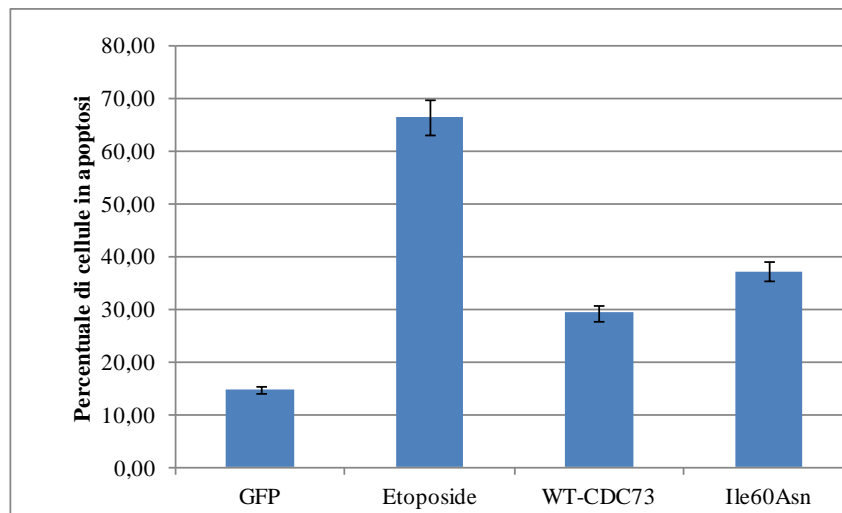


Figura 4.13. Analisi citofluorimetrica dell'apoptosi basale in cellule HEK293A trasfettate con i plasmidi GFP, wt-CDC73 e Ile60asn (medie di 3 esperimenti indipendenti); Etoposide: cellule trattate con etoposide 50 μ M (controllo positivo)

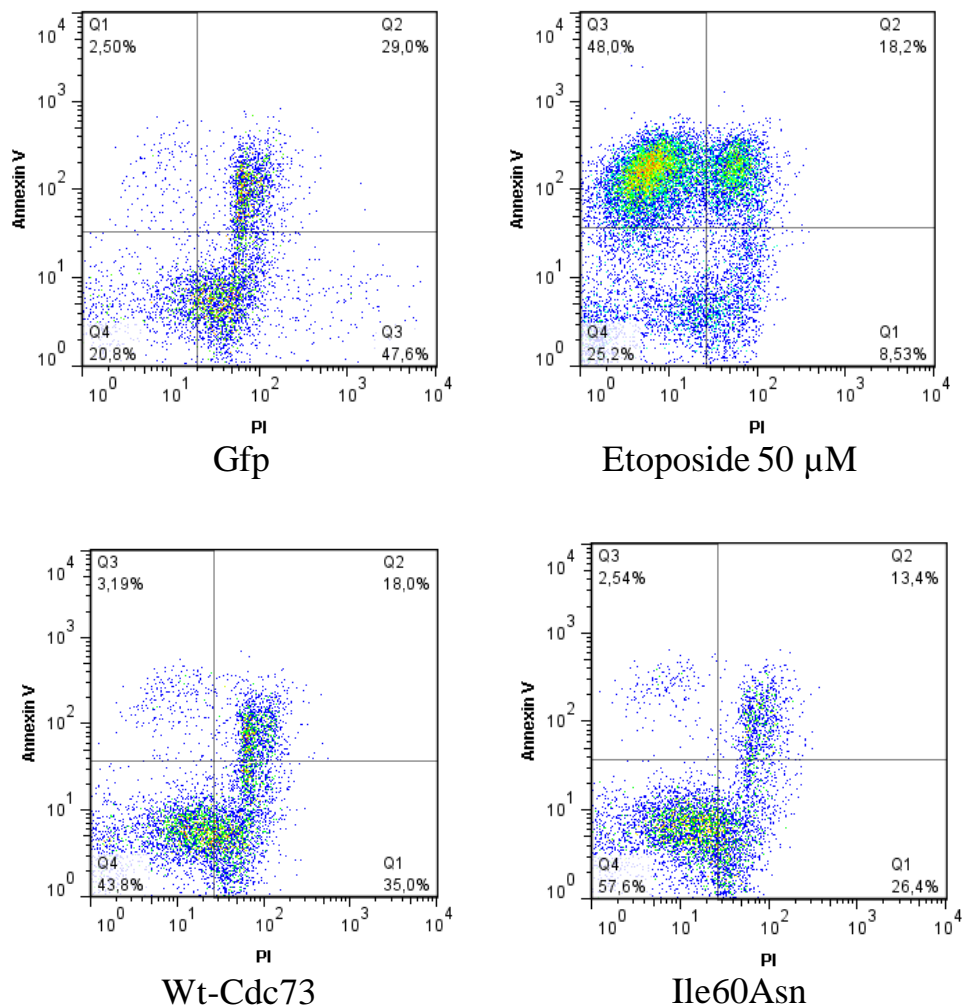


Figura 4.14. Esempio di risultato di analisi dell'apoptosi effettuata valutando l'incorporazione di Annessina V-APC e di ioduro di propidio tramite citofluorimetria a flusso. In ordinata è rappresentata l'intensità del segnale dato dall'incorporazione di Annessina V-APC, mentre in ascissa è riportata l'intensità del segnale dello ioduro di propidio.

4.2. Analisi dei miRNA nei tumori paratiroidi e del loro ruolo nella regolazione dell'espressione di parafibromina

4.2.1. Analisi dei dati di espressione di miRNA in adenomi e carcinomi paratiroidi: preprocessing e Significance Analysis of Microarrays (SAM)

E' stata analizzata l'espressione di 866 microRNA umani nei tessuti di 3 carcinomi e 8 adenomi paratiroidi sporadici, ognuno dei quali in duplicato.

Nella fase di *preprocessing* dei dati, sulla base degli *MvA plot* (figura 4.15) è stato necessario escludere dall'analisi 3 casi di adenoma paratiroideo (PA1, PA4 e PA7).

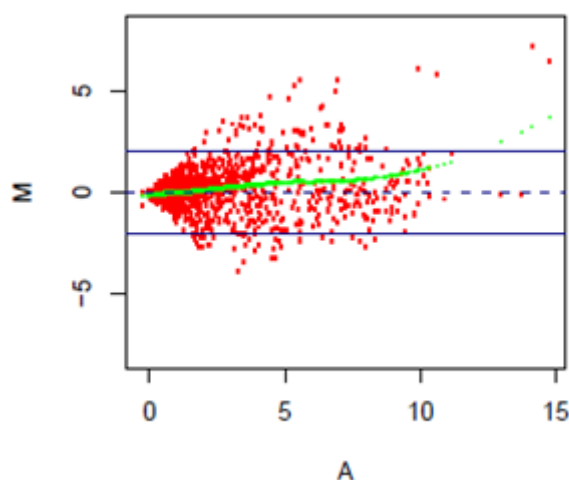


Figura 4.15. Esempio di *MvA plot* di adenoma paratiroideo (PA4) escluso dall'analisi dei dati

Dopo la normalizzazione (*loess*), il *dataset* iniziale, costituito dagli 866 miRNA umani rappresentati su ciascun microarray, è stato ridotto ad un set di 353 miRNA che mostravano almeno 3 valori di espressione in entrambe le classi fenotipiche (adenomi e carcinomi). La selezione SAM effettuata non ha evidenziato la presenza di alcun miRNA differenzialmente espresso tra tumori paratiroidi benigni e maligni.

4.2.2. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)

La *Gene Set Enrichment Analysis* ha considerato un totale di 35 *pathways* cellulari oggetto di modulazione da parte di miRNA, scelte dal database miRWalk (<http://www.ma.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>).

Tra le vie analizzate, 33 miRNA *pathways* sono state identificate come *up*-regolate negli adenomi rispetto ai carcinomi paratiroidi: fra queste, due sono risultate significative per $FDR < 25\%$, ovvero quella dell'oncosoppressore PTEN e quella della protein chinasi C (PKC) (Figura 4.16).

Due *pathways* sono risultate essere *up*-regolate nei carcinomi rispetto agli adenomi, e fra di esse la *pathway* di *Sonic hedgehog* (SHH) è risultata significativa per FDR < 25%. (Figura 4.16).

Gli elenchi dei miRNA che, secondo miRWALK, intervengono nelle *pathways* di PKC, PTEN e SHH sono riportati in Appendice, nelle Sezioni B, C, e D.

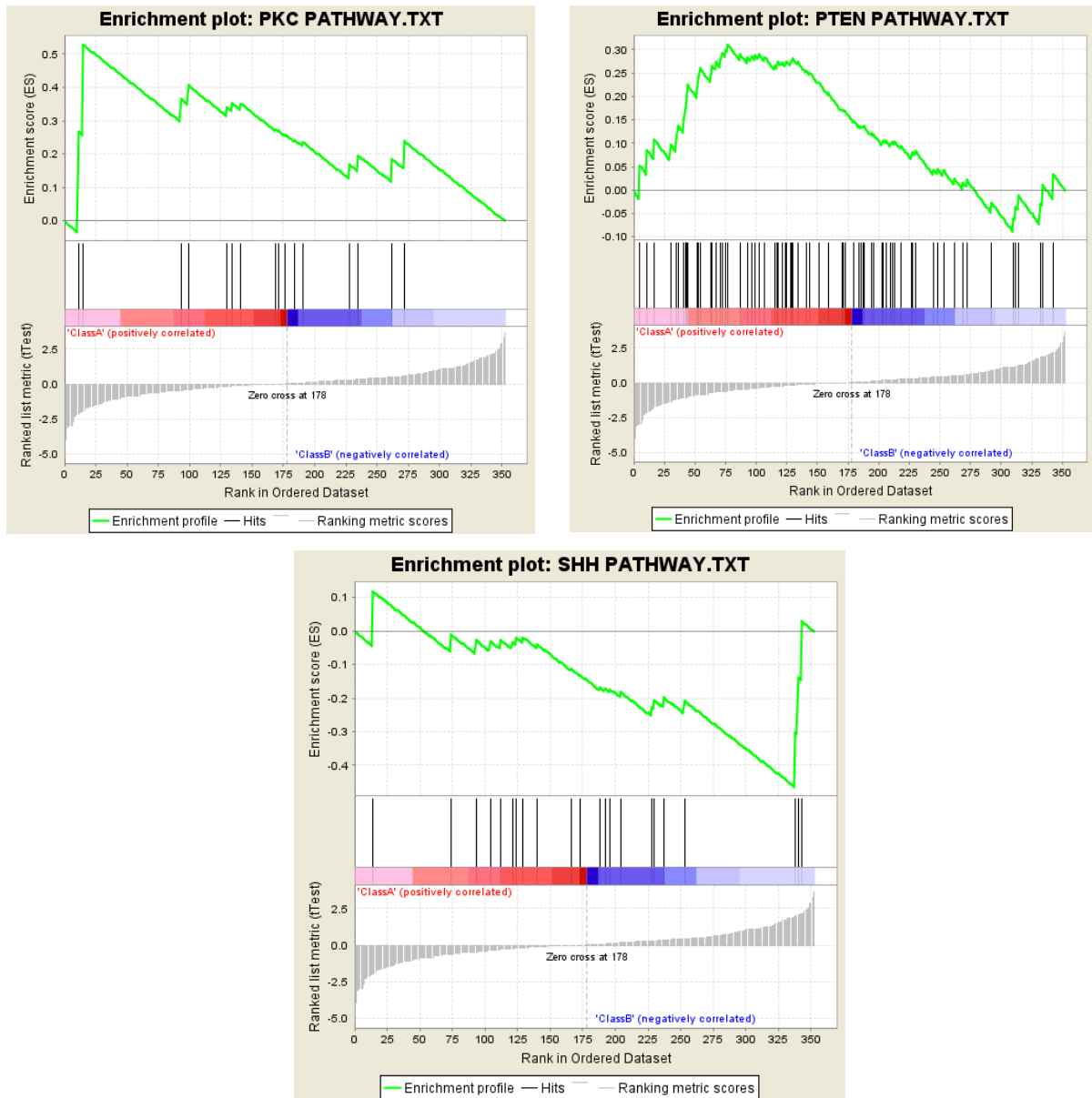


Figura 4.16. Rappresentazione grafica dell' *enrichment* relativo alle *pathways* PKC, PTEN e SHH; *ClassA*: adenomi; *ClassB*: carcinomi

4.2.3. Selezione di miR-9, evidenziato dalla GSEA, per validazione di parafibromina come target

L'analisi effettuata permette anche di identificare quali sono i miRNA che intervengono effettivamente nelle *pathways* alterate, e di visualizzare la loro posizione lungo una lista

ordinata secondo valori decrescenti di espressione dagli adenomi ai carcinomi. E' stata effettuata una ricerca su dati presenti in letteratura sui miRNA che modulano le vie di segnalazione di PKC, PTEN e SHH riportati nelle liste ottenute, al fine di identificare i miRNA con i target appartenenti alle vie in oggetto (validati sperimentalmente) più interessanti per approfondimenti *in vitro*. Inoltre, utilizzando il database miRWalk, sono stati ricercati altri target molecolari di possibile interesse, anche se solo predetti *in silico* e non funzionalmente collegati alle 3 *pathways* evidenziate dalla GSEA.

La scelta è caduta miR-9, riportato nelle 2 *pathways* di PKC e PTEN, che si colloca all'undicesimo posto nella lista di espressione dei miRNA, e risulta quindi essere uno dei miRNA più espressi negli adenomi rispetto ai carcinomi. Questo miRNA è anche parte del *leading edge subset* per entrambe le vie di segnalazione.

MiR-9 ha, come target verificato sperimentalmente, il fattore di trascrizione NF-kB, e attraverso la regolazione di questa proteina sembra inibire la crescita del carcinoma ovarico (Bazzoni et al., 2009; Guo et al., 2009).

MiR-9 risulta essere legato anche alla via di segnalazione di PTEN: infatti, il miRNA sembra fungere da oncosoppressore nei carcinomi a cellule squamose di testa e collo, inibendo la proliferazione cellulare ed innalzando indirettamente il livello di espressione dell'oncosoppressore PTEN (Minor et al., 2012).

Mir-9 ha infine, come target predetto *in silico* ma non indagato sperimentalmente, anche CDC73, il gene codificante per parafibromina, come predetto dal software MiRWALK e da altri 6 algoritmi (DIANAmT, miRanda, RNAhybrid, PICTAR4, PICTAR5, TargetScan) considerati da MiRWALK (Figura 4.17).

Gene Name	MicroRNA	StemLoop ID	DIANAmT	miRanda	miRDE	miRWalk	RNAhybrid	PICTAR4	PICTAR5	PITA	RNA22	Targetscan	SUM
CDC73	hsa-miR-9	hsa-mir-9-3	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	7

Figura 4.17. Selezione del risultato di miRWALK relativo alla predizione di target di miR-9 che evidenzia CDC73 come possibile target secondo differenti algoritmi.

4.2.4. Saggio dell'attività luciferasica in cellule HEK293A co-trasfettate con l'UTR 3' di CDC73 e miR-9

E' stato rilevato un decremento statisticamente significativo ($P=0.006$) nell'attività luciferasica nelle cellule HEK293A co-trasfettate con il precursore di miR-9 ed il plasmide pmiR-GLO recante la sequenza UTR 3' di CDC73. Il decremento non era presente nelle cellule trasfettate con il miRNA- controllo negativo (Figura 4.18).

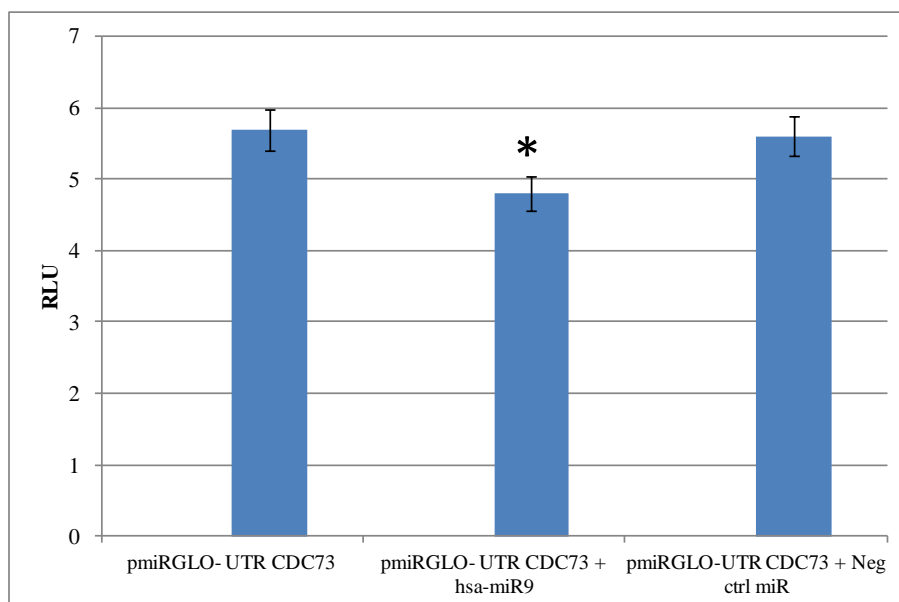


Figura 4.18. Saggio dell'attività luciferasica in cellule HEK293A trasfettate con pmiRGLO e miR-9 o con miRNA- controllo negativo; RLU= *Relative Light Units*; *: $P < 0,05$ rispetto al controllo (pmiRGLO-UTR CDC73)

4.2.5. Effetto della trasfezione di miR-9 sull'espressione di parafibromina in cellule HEK293A

Quarantotto ore dopo la trasfezione, le cellule HEK293A trasfettate con 200 pmol di precursore di miR-9 mostrano una diminuzione nell'espressione di parafibromina endogena. Tale diminuzione non era presente nelle cellule trasfettate con il miRNA-controllo negativo (Figura 4.19).

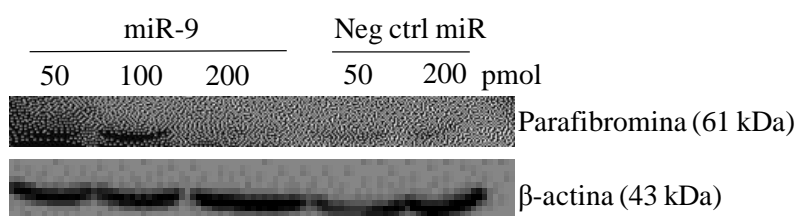


Figura 4.19. *Western blot* per parafibromina in cellule HEK293A trasfettate con miR-9 o con un miRNA-controllo negativo.

4.2.6. Effetto della trasfezione di miR9 sull'espressione di ciclina D1 in cellule HEK293A

L'espressione di ciclina D1, il fattore di controllo del ciclo cellulare negativamente regolato da parafibromina, è risultata essere più elevata nelle cellule HEK293A trasfettate con il precursore di miR-9 rispetto a quelle trasfettate con il miRNA-controllo negativo (Figura 4.20).

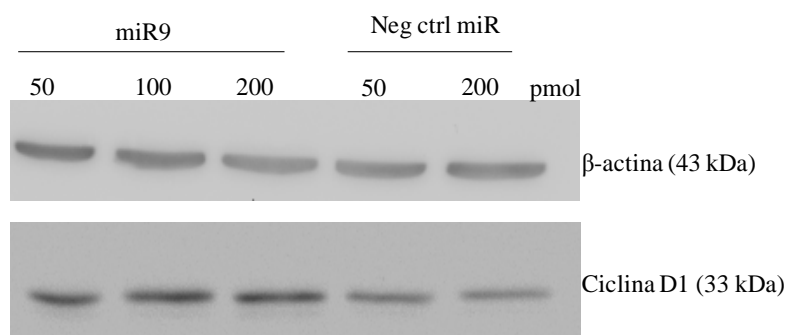


Figura 4.20. *Western blot* per ciclina D1 in cellule HEK293A trasfettate con miR-9 o con un miRNA-controllo negativo.

4.2.7. Immunoistochimica per parafibromina e ciclina D1 e correlazione con l'espressione di miR-9 secondo real time-RT PCR

L'analisi immunoistochimica per parafibromina, effettuata su sezioni fissate e incluse in paraffina dei tumori paratiroidei sporadici sottoposti allo studio con miRNA-microarrays e inclusi nelle analisi SAM e GSEA, non ha evidenziato differenze significative riguardo alla percentuale di espressione nucleare della proteina tra neoplasie paratiroidee benigne (espressione nucleare media 65 ± 33) e maligne (60 ± 30).

L'immunoreattività per ciclina D1, invece, era superiore nei carcinomi ($51,7 \pm 37$) rispetto agli adenomi paratiroidei (15 ± 12). È stata notata un'ampia variabilità nell'espressione di parafibromina sia negli adenomi (range 15-100%) che nei carcinomi (30-90%). Anche l'espressione nucleare di ciclina D1 si è dimostrata variabile sia nei tumori benigni (range 5-35%) che in quelli maligni (15-90%) (Figure 4.21 e 4.22).

Non è stata riscontrata alcuna correlazione tra l'espressione di miR-9 secondo i risultati di real-time-RT PCR, l'immunoreattività per parafibromina e quella per ciclina D1 (Tabella 4.1.)

Campioni	MiR-9	Parafibromina	Ciclina D1
Adenomi			
PA2	1,01	15	15
PA3	53,35	100	5
PA5	3,79	55	5
PA6	0,60	90	35
PA8	0,23	65	15
Media± deviazione standard		65±33	15±12
Carcinomi			
PC1	0,08	90	90
PC2	0,99	30	50
PC3	14,10	60	15
Media± deviazione standard		60±30	51,7±37

Tabella 4.1. Risultati della real-time RT-PCR per miR-9 (quantificazione secondo il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizzando come riferimento per la normalizzazione la mediana del valore di ΔCt di tutti i campioni) e dell'immunoistochimica per parafibromina e ciclina D1 (percentuali di positività nucleare)

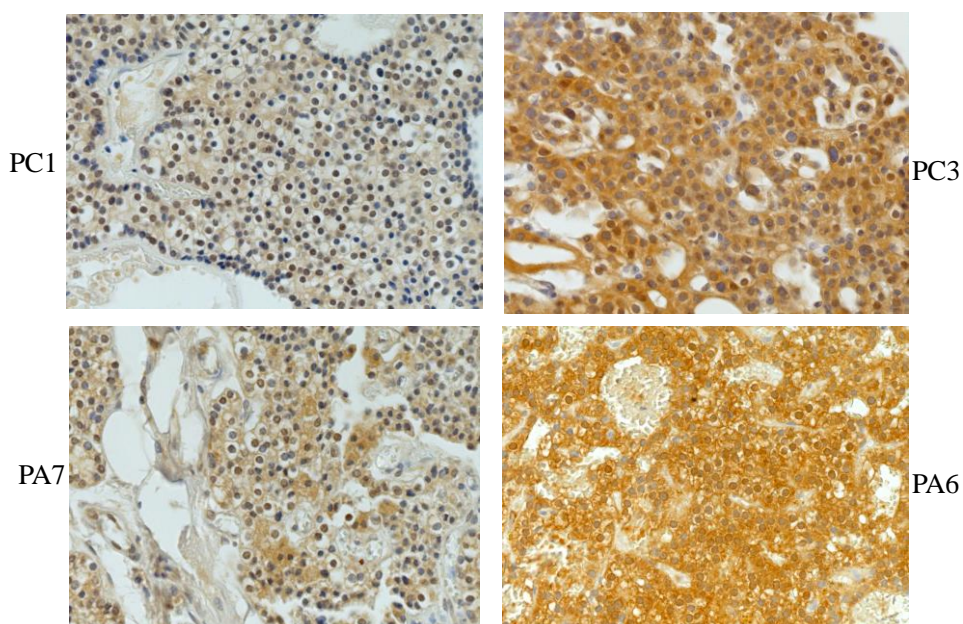


Figura 4.21. Esempio di reazioni immunoistochimiche per parafibromina (40X) su carcinomi (PC1, PC3) ed adenomi (PA7, PA6) paratiroidi sporadici

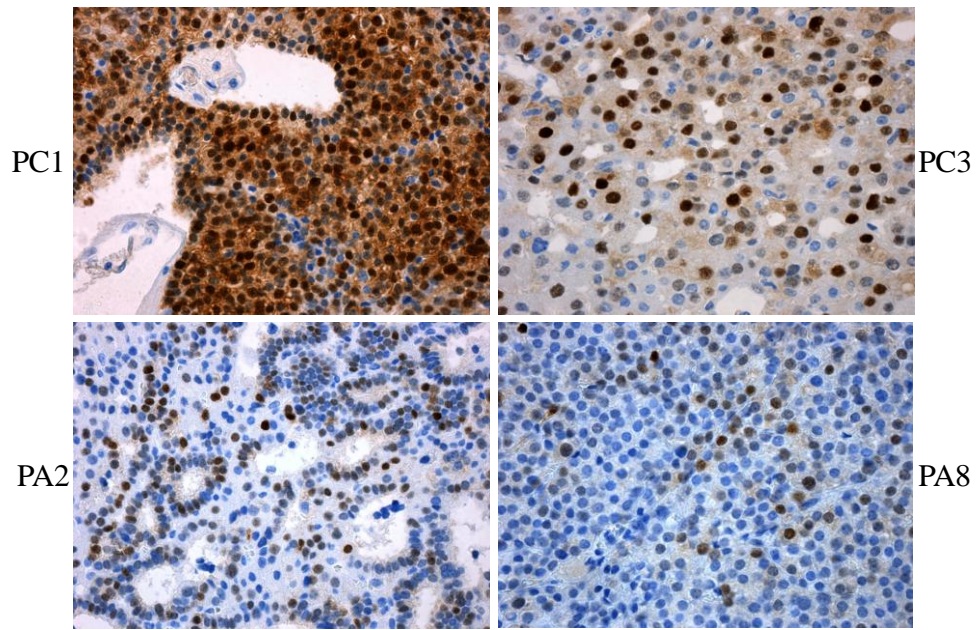


Figura 4.22. Esempio di reazioni immunostochimiche per ciclina D1 (40X) su carcinomi (PC1, PC3) ed adenomi (PA2, PA8) paratiroidei sporadici

CAPITOLO 5

DISCUSSIONE

5.1 Identificazione e caratterizzazione di una mutazione missenso di *CDC73*

Nel presente studio, è stata attuata la ricerca di mutazioni somatiche di *CDC73* nel fibroma ossificante mandibolare di una paziente affetta da iperparatiroidismo primitivo, proveniente da una famiglia con mutazione germinale *frameshift* in eterozigosi di *CDC73*. La paziente oggetto dello studio, oltre ad essere stata sottoposta ad intervento chirurgico per la rimozione di un singolo adenoma paratiroideo e ad essere affetta da poliposi uterina, nel 2009 aveva subito la resezione di una massa mandibolare, che, dal punto di vista istopatologico, è stata definita come fibroma ossificante.

I fibromi ossificanti mandibolari sono rari e attualmente poco caratterizzati dal punto di vista molecolare e genetico. Queste neoplasie sono lesioni fibro-ossee che originano dalla membrana periodontale (uno strato di tessuto connettivo fibroso che circonda le radici dentali), hanno carattere di benignità e possono insorgere in diversi siti dell'ossatura maxillo- facciale (*Gondivkar et al., 2011*). Le lesioni sono caratterizzate da un'intensa immunoreattività per le BMP (*bone morphogenetic proteins*) -2 e -4, oltre che per osteopontina ed osteocalcina (*Ono et al., 2007*).

Riguardo allo stato mutazionale di *CDC73* e alla presenza/ assenza di immunoreattività per parafibromina, in letteratura è presente un unico studio, condotto su fibromi ossificanti (OF) e fibromi ossificanti giovanili (JOF) sporadici (*Pimenta et al., 2006*). Lo studio identifica mutazioni somatiche e germinali di *CDC73* negli OF sporadici (in 2 casi su 3), in soggetti apparentemente non affetti da HPT-JT. Per quanto riguarda l'espressione di parafibromina nel tessuto tumorale, tutti i casi di OF analizzati, inclusi quelli con mutazione, mostrano un'intensa positività nucleo-citoplasmatica per parafibromina. Gli autori dello studio concludono che i OF possano quindi insorgere a causa di un meccanismo di aploinsufficienza a carico di *CDC73*.

Per quanto riguarda le forme sicuramente sindromiche del fibroma ossificante, ovvero quelle riscontrate in soggetti affetti da sindrome HPT-JT, non sono al momento presenti studi di letteratura. Questo fatto è sicuramente da imputarsi alla bassa penetranza del fibroma ossificante mandibolare come manifestazione della sindrome HPT- JT (con una prevalenza del 25-50%), che è di per sé una condizione patologica molto rara,

considerando che sono state fino ad oggi descritte e caratterizzate circa 50 famiglie affette.

Tramite sequenziamento diretto dell'intera sequenza codificante e delle giunzioni esone-introne del gene *CDC73* nel tessuto tumorale del fibroma ossificante della paziente, è stata identificata una mutazione missenso somatica in eterozigosi ancora non nota in letteratura. Tale mutazione, una transversione da timina in adenina in posizione 179 nella sequenza codificante di *CDC73*, porta ad una sostituzione amminoacidica da isoleucina ad asparagina al residuo 60 di parafibromina, la proteina codificata da *CDC73*.

La maggior parte delle alterazioni riscontrate a carico di *CDC73*, come per la maggior parte dei geni oncosoppressori, è di tipo *frameshift* o nonsense, e recentemente sono stati riportati anche due casi di delezioni dell'intero gene (*Cascò et al., 2011; Domingues et al., 2012*). Le conseguenze di queste mutazioni sono generalmente abbastanza facili da prevedere, in quanto portano alla completa assenza della proteina o alla produzione di una proteina tronca o con alterazioni che interessano molti residui, e compromettono quindi facilmente la corretta funzionalità della proteina.

Risulta invece sicuramente più complesso affermare che sostituzioni di un singolo amminoacido possano effettivamente indurre un'alterazione tale da inattivare un gene oncosoppressore. Generalmente, le mutazioni missenso hanno conseguenze funzionali quando portano all'inattivazione di residui critici per la funzionalità della proteina, ad un alterato *folding* o ad una diminuzione della stabilità della proteina stessa. Purtroppo, per quanto concerne parafibromina, gli effetti delle alterazioni di singolo amminoacido sono per lo più difficili da prevedere: infatti, a parte alcuni domini di interazione con altre proteine (compresi tra gli amminoacidi 200 e 413) e i segnali di localizzazione nucleare (residui 136-139) e nucleolare (amminoacidi 76-92, 192-194 e 393-409), non sono noti nella proteina altri particolari domini strutturali, e nessuna struttura cristallografica è stata a tutt'oggi pubblicata.

Di particolare interesse, inoltre, è il fatto che un'elevata percentuale delle mutazioni missenso note interessa la porzione N-terminale di parafibromina, e in particolare gli amminoacidi tra il 59 e il 95, codificati dagli esoni 2 e 3 di *CDC73*. Questo fatto permette di ipotizzare la presenza, a livello di estremità N-terminale della proteina, di uno o più domini critici per l'attività oncosoppressoria di parafibromina.

Lo studio *in vitro* di tutti i mutanti missenso fino ad oggi identificati (dei quali è riportata una revisione in Sezione A e Tabella A1 in Appendice) potrebbe essere di

grande utilità per caratterizzare una porzione di parafibromina a tutt'oggi scarsamente caratterizzata.

Il primo approccio impiegato in questo studio per valutare l'effettiva patogenicità della mutazione somatica Ile60Asn identificata è stato l'utilizzo di MutationTaster, un database creato per fornire indicazioni riguardo al potenziale patogenetico di sostituzioni di singolo nucleotide, delezioni o inserzioni geniche (Schwarz *et al.*, 2010). Il programma impiega un classificatore bayesiano che attua una comparazione dell'alterazione di interesse con più di 50000 mutazioni sicuramente patogenetiche e circa 500000 polimorfismi noti; nel caso della sostituzione Ile60Asn nella sequenza proteica di parafibromina, MutationTaster ha classificato l'alterazione come “*disease causing*”, con una probabilità di successo della predizione vicina al 100%. Inoltre, con lo stesso database è stato possibile effettuare un'analisi di conservazione dell'amminoacido, tramite allineamento tra le sequenze proteiche omologhe di dieci specie diverse e la sequenza di parafibromina umana normale e mutata. L'allineamento ha evidenziato un elevato grado di conservazione dell'isoleucina in posizione 60 di parafibromina: l'amminoacido risulta essere infatti identico in 8 su 10 delle specie considerate, mentre risulta essere sostituito da una leucin in *D. melanogaster* e *C. elegans*.

Si è tentato anche un approccio di predizione strutturale tramite il server I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) (Roy *et al.*, 2010): tuttavia, sulla base della sola sequenza amminoacidica, è stato possibile solamente ipotizzare la presenza di una struttura ad α -elica a livello del dominio interessato alla maggior parte delle mutazioni missenso.

Il risultato di queste predizioni *in silico* ha evidenziato la necessità di approfondire con analisi *in vitro* le possibili conseguenze funzionali dell'alterazione Ile60Asn di parafibromina da noi identificata. In particolare, sono stati valutati gli effetti della mutazione su localizzazione subcellulare, livello di espressione della proteina e di alcuni dei suoi target trascrizionali, proliferazione cellulare e capacità di induzione di apoptosi. Tutti gli studi *in vitro* sono stati effettuati mediante trasfezione di plasmidi esprimenti la forma *wild-type* o il mutante Ile60Asn di parafibromina in cellule della linea HEK293A. Lo studio della localizzazione subcellulare di parafibromina normale o mutata, condotto utilizzando la microscopia a fluorescenza 48 ore dopo la trasfezione, ha mostrato che la proteina Ile60Asn mantiene la localizzazione nucleare generalmente osservata per parafibromina *wild-type*. Tuttavia, il mutante perde la localizzazione a livello del

nucleolo, come evidenziato tramite una colocalizzazione con la proteina nucleolare nucleofosmina (B23).

Il fatto che l'espressione nucleare di parafibromina Ile60Asn sia mantenuta non sorprende, considerando che l'alterazione si colloca a molti residui di distanza dal segnale di localizzazione nucleare, compreso tra gli amminoacidi 125 e 139 (*Lin et al., 2007*). Il segnale di localizzazione nucleolare (NoLS), che sembra essere compreso tra i residui 76 e 92 (*Hahn et al., 2007*), è anch'esso distante dalla mutazione missenso identificata, e non è quindi direttamente interessato dall'alterazione.

Il recente studio funzionale di Panicker e colleghi (*Panicker et al., 2010*), condotto sulla mutazione missenso Leu95Pro, evidenzia una perdita della localizzazione nucleolare della proteina mutata, analogamente a quanto da noi osservato con la mutazione Ile60Asn. Nel caso del mutante Leu95Pro questo risultato è probabilmente imputabile all'immediata prossimità dell'alterazione con il NoLS.

Nel caso della mutazione Ile60Asn, è evidente che l'isoleucina in posizione 60 risulta maggiormente distante dall'inizio del NoLS, e quindi risulta più difficile spiegare la perdita della localizzazione nucleolare. Sembra però utile sottolineare che la localizzazione nucleolare di una proteina può derivare anche, piuttosto che dalla presenza di una specifica sequenza amminoacidica che funge da NoLS, da un'interazione diretta o indiretta con componenti nucleolari (rDNA, trascritti o componenti proteiche). Quindi, alcuni residui di una proteina possono essere responsabili di interazioni ad alta affinità con proteine o acidi nucleici nucleolari, determinandone quindi la localizzazione nel nucleolo (*Emmott et al., 2009*).

L'espressione di parafibromina a livello del nucleolo sembra rivestire un ruolo importante anche *in vivo*: infatti, uno studio effettuato utilizzando immunistochemica e microscopia ad alto ingrandimento su una serie di tumori paratiroidei sporadici, dimostra la perdita dell'immunoreattività nucleolare per parafibromina in alcuni casi di carcinoma e in un caso di adenoma atipico, tutti con mutazioni di *CDC73* (*Juhlin et al., 2011*). La perdita della localizzazione nucleolare, quindi, potrebbe avere un ruolo tumorigenico indipendentemente dalla presenza di parafibromina a livello del nucleo. Gli autori dello studio suggeriscono quindi che, nei casi in cui la diagnosi istopatologica di malignità per un tumore paratiroideo risulti dubbia, sia utile accertare l'immunoreattività nucleolare (e non solamente quella nucleare) per parafibromina.

Un altro aspetto interessante dell'analisi tramite microscopia a fluorescenza riguarda la quantità di parafibromina mutata espressa dalle cellule HEK293A trasfettate: infatti, appare evidente che il livello di espressione di parafibromina Ile60Asn risulta essere

nettamente inferiore di quello di parafibromina normale. Questo dato è stato ulteriormente confermato effettuando un'analisi dell'espressione di parafibromina (sia trasfettata che endogena) nelle cellule HEK293A tramite *western blot*, metodica che consente di ottenere un dato quantitativamente più preciso.

Lo studio con *western blot* ha effettivamente confermato che l'espressione di parafibromina *wild-type* è notevolmente superiore a quello di parafibromina Ile60Asn. Sembra opportuno segnalare che anche il livello di espressione di parafibromina endogena sembra variare in risposta alla trasfezione: infatti, le cellule trasfettate con parafibromina normale esprimono più proteina endogena rispetto a quelle trasfettate con il mutante Ile60Asn; queste ultime, a loro volta, esprimono una maggior quantità di parafibromina endogena rispetto alle cellule trasfettate con il solo plasmide di controllo. Anche il mutante Leu95Pro mostra una diminuzione nell'espressione rispetto alla sua controparte *wild-type*. Gli autori dello studio (*Panicker et al., 2010*) stabiliscono anche che il decremento nel livello di espressione del mutante non sembra essere dovuto ad una maggiore degradazione da parte del proteasoma, come evidenziato dal fatto che la differenza nel livello di espressione delle due proteine non viene eliminata o ridotta utilizzando inibitori dell'attività proteasomica.

Tramite *western blot* non è stata investigata solamente l'espressione di parafibromina, ma anche quella di due dei suoi principali target trascrizionali: come precedentemente descritto, infatti, parafibromina regola negativamente la trascrizione di ciclina D1, proteina fondamentale per il controllo della progressione nel ciclo cellulare (*Yang et al., 2010*), e del proto-oncogene c-Myc (*Lin et al., 2007*).

Per quanto concerne l'espressione di ciclina D1, è stato rilevato un lieve decremento nel suo livello di espressione solo nelle cellule HEK293A trasfettate con la forma *wild-type* rispetto alle cellule trasfettate con parafibromina Ile60Asn o con il vettore di controllo.

Uno studio di Woodard e colleghi (*Woodard et al., 2005*) riporta un effetto molto più marcato della trasfezione di parafibromina *wild-type* in cellule NIH-3T3 e HEK293: infatti, le cellule che iperesprimono la forma normale di parafibromina mostrano una totale assenza di espressione di ciclina D1, che risulta invece normalmente espressa nelle cellule trasfettate con il mutante Leu64Pro. Nel presente studio, l'azione inibitoria di parafibromina sull'espressione di ciclina D1 non appare così evidente.

Anche per quanto riguarda c-Myc, la trasfezione con parafibromina *wild-type* o Ile60Asn non sembra alterare l'espressione del proto-oncogene rispetto al controllo.

Il fatto che gli effetti sull'espressione di ciclina D1 e c-Myc siano così lievi è confermato anche dal risultato dello studio della proliferazione cellulare effettuato

tramite saggio di incorporazione di bromodeossiuridina. Infatti, le differenze rilevate nel livello di proliferazione delle cellule HEK293A trasfettate con il plasmide wt-CDC73 o con il plasmide Ile60Asn non sono statisticamente significative, così come non sono state evidenziate differenze rispetto alle cellule di controllo.

A differenza del saggio di proliferazione con bromodeossiuridina, l'analisi del ciclo cellulare mediante citofluorimetria a flusso ha messo in evidenza uno spostamento verso le fasi G2-M delle cellule trasfettate con il mutante Ile60Asn rispetto alle cellule di controllo e a quelle esprimenti la forma *wild-type* di parafibromina. Questo risultato è dovuto al fatto che l'analisi dei dati derivanti dalla citofluorimetria può essere focalizzata solo sulle cellule effettivamente trasfettate (ossia quelle che esprimono la GFP), escludendo le cellule che non esprimono la proteina codificata dal plasmide. Pertanto, il dato derivante dall'analisi citofluorimetrica non ci sembra in contrasto con quanto derivante dal saggio di incorporazione con bromodeossiuridina.

Oltre all'effetto sulla proliferazione cellulare, nel presente studio si è voluto verificare anche, tramite citofluorimetria a flusso, il comportamento del mutante Ile60Asn di parafibromina rispetto all'induzione di apoptosi. Parafibromina sembra promuovere l'apoptosi, sia basale che derivante dall'induzione di danno al DNA, quando trasfettata in cellule HeLa (*Lin et al., 2007*). I risultati dei nostri esperimenti, condotti in cellule HEK293A quarantotto ore dopo la trasfezione, non evidenziano tuttavia significative differenze nella tendenza spontanea all'apoptosi tra le cellule trasfettate con parafibromina *wild-type* e quelle trasfettate con il vettore di controllo. Non sono state rilevate differenze nemmeno tra le cellule trasfettate con il mutante Ile60Asn e le cellule trasfettate con parafibromina normale o con il controllo.

In vivo, in un modello di *knock-out* genico murino, la delezione controllata di *Cdc73* risulta in un incremento dell'apoptosi: probabilmente, questo fenomeno è dovuto alla diminuzione dell'espressione di alcuni geni target di parafibromina che codificano per proteine con azione trofica in molti tipi cellulari (come Igf1 e Igf2), o per proteine con azione pro-apoptotica (*Wang et al., 2008*). L'accertamento delle putative proprietà pro-apoptotiche di parafibromina richiede quindi probabilmente ulteriori approfondimenti.

I risultati dell'analisi della localizzazione subnucleare e dello studio del ciclo cellulare sembrano indicare che, nonostante il livello di espressione di parafibromina mutata sia inferiore a quello della proteina *wild-type*, il mutante missenso Ile60Asn non dia origine semplicemente ad una proteina inattiva, ma ad una proteina con caratteristiche di dominanza negativa: il mutante sembra infatti in grado di interferire con la funzione anti-proliferativa di parafibromina endogena e di stimolare la proliferazione cellulare.

Probabilmente, la perdita della localizzazione nucleolare di parafibromina fa sì che la proteina non possa interagire con qualche partner molecolare a tutt'oggi ignoto, e non possa esercitare quindi pienamente le sue funzioni.

Le nostre conclusioni appaiono pienamente in linea con quelle dello studio di Panicker e colleghi sulla mutazione Leu95Pro (*Panicker et al., 2010*), che sembra esibire caratteristiche molto simili a quelle della sostituzione Ile60Asn.

Gli effetti funzionali osservati nel presente studio non sono eclatanti, dal momento che il mutante Ile60Asn esibiva un basso livello di espressione, e data la presenza di parafibromina normale endogena nelle cellule HEK293A, da noi utilizzate per tutti gli esperimenti *in vitro*. Tuttavia, è da considerare che, *in vivo*, a livello del tessuto tumorale del fibroma ossificante, l'effetto stimolante su crescita e proliferazione della mutazione Ile60Asn non viene contrastato dalla presenza della forma *wild-type* di parafibromina, in quanto la paziente è portatrice, oltre che della mutazione missenso somatica, anche di una mutazione *frameshift* germinale di *CDC73*: è facile quindi ipotizzare che nessuno dei due alleli produca una forma di parafibromina con effettiva capacità antiproliferativa.

La mutazione somatica Ile60Asn di *CDC73*, finora mai descritta in letteratura, è stata identificata nel fibroma ossificante mandibolare insorto in una paziente con HPT-JT: si tratta del primo studio presente in letteratura che approfondisce gli aspetti molecolari del fibroma ossificante insorto nell'ambito di una forma sindromica di iperparatiroidismo primitivo.

La scarsità delle conoscenze a livello molecolare su questo tipo di neoplasie, unito al fatto che l'alterazione identificata interessasse un singolo amminoacido, hanno reso necessari studi *in vitro* per determinare se la mutazione di *CDC73* potesse effettivamente avere un ruolo nella patogenesi di questo fibroma ossificante. La sostituzione Ile60Asn poteva infatti rappresentare un semplice polimorfismo, e l'insorgenza del tumore mandibolare poteva essere dovuta all'azione dell'eccesso di PTH a livello di un sito dell'ossatura maxillo-facciale. Tuttavia, i risultati sembrano indicare un effettivo ruolo tumorigenico dell'alterazione identificata nella massa mandibolare della paziente.

Dal punto di vista molecolare, risulta evidente la necessità di identificare le proteine che interagiscono con il dominio N-terminale di parafibromina. Un possibile approccio è verificare la presenza di interazioni fisiche tra parafibromina e proteine nucleolari note, data la rilevanza della localizzazione nucleolare per la corretta funzionalità della proteina.

5.2 MiRNA- *profiling* nei tumori paratiroidi sporadici e validazione di parafibromina come target di miR-9

Lo studio del profilo di espressione dei miRNA, attuato utilizzando la metodica dei miRNA- microarrays in un gruppo di 3 carcinomi ed 8 adenomi paratiroidi sporadici, non ha messo in evidenza alcun miRNA significativamente alterato tra tumori benigni e maligni. L'analisi SAM, infatti, non ha individuato nessun miRNA differenzialmente espresso tra le due categorie analizzate.

Questo risultato può essere in parte spiegato considerando la drastica riduzione del numero di miRNA analizzati dopo aver effettuato la normalizzazione (loess) dei dati a disposizione: il *dataset* di miRNA effettivamente analizzabili è stato ridotto, dagli iniziali 866 miRNA umani rappresentati sui microarrays, a soli 353 miRNA con almeno tre valori di espressione in entrambe le classi fenotipiche (adenomi e carcinomi)

Anche il numero di campioni di tessuto analizzabili è stato ridotto in seguito all'analisi degli *MvA plot*, che ha portato ad escludere, per scarsa riproducibilità, 3 degli 8 adenomi inizialmente sottoposti a miRNA-*profiling*.

E' necessario anche tenere conto del fatto che i due fenotipi confrontati sono entrambi fenotipi tumorali, in quanto la comparazione è stata effettuata tra tumori paratiroidi sporadici benigni e maligni (adenomi vs. carcinomi), e non tra tessuto neoplastico e corrispondente tessuto normale: si può quindi ipotizzare che le differenze nell'espressione di molti geni e miRNA non siano effettivamente eclatanti.

Lo studio di Rahbari e colleghi (*Rahbari et al., 2010*), che considera una casistica di tumori molto più ampia rispetto a quella impiegata nel presente lavoro (12 adenomi vs. 9 carcinomi), identifica 3 soli miRNA significativamente alterati tra tumori paratiroidi benigni e maligni (miR-26b, miR-30b, e miR-126*, significativamente meno espressi nei carcinomi rispetto agli adenomi), e il livello di un solo miRNA, ovvero miR-126* viene considerato un buon differenziatore tra tumori paratiroidi benigni e maligni. Sembra interessante segnalare che la diminuzione dell'espressione di miR-126* è stata riportata anche in linee cellulari di carcinoma di colon, polmone e prostata e che, in generale, questo miRNA è coinvolto nel controllo di proliferazione, migrazione e invasività cellulare (*Meister et al., 2010*).

L'altro studio di miRNA-*profiling* nei tumori paratiroidi sporadici non identifica nessun miRNA che, preso singolarmente, possa discriminare tra adenomi e carcinomi; tuttavia, uno *score* che considera le quantità relative (RQ) dei tre miRNA con maggiore

variazione (miR-222, miR-296, and miR-503) sembra consentire una distinzione tra adenomi e carcinomi paratiroidi, così come tra ghiandole paratiroidi normali e neoplastiche (Corbetta et al., 2010).

I due studi presenti in letteratura, dunque, identificano un singolo miRNA che possa essere utile nella discriminazione tra tumori paratiroidi benigni e maligni, e non concordano tra di loro sui miRNA di potenziale interesse nella tumorigenesi paratiroidi. Questo fatto, unito al risultato negativo ottenuto dall'analisi SAM effettuata sulla nostra casistica, sottolinea la necessità di nuovi studi di miRNA-*profiling* nei tumori paratiroidi. Ovviamente, la rarità dei carcinomi paratiroidi sporadici fa sì che pochi gruppi di ricerca possano avere a disposizione casistiche ampie come quella dello studio di Rahbari (Rahbari et al., 2010).

Successivamente all'analisi SAM, è stata effettuata, in collaborazione con il DEI dell'Università degli Studi di Padova, un'analisi denominata *Gene Set Enrichment Analysis* (Subramanian et al., 2005), attualmente molto utilizzata negli studi di espressione effettuati con microarrays.

Il problema di tali studi, infatti, non è l'ottenimento di un profilo di espressione, quanto piuttosto l'interpretazione dei risultati dal punto di vista biologico. Un'analisi sul singolo gene (o, come in questo caso, miRNA) può infatti non evidenziare importanti effetti su *pathways*, dato che i processi cellulari spesso interessano set di geni che agiscono in maniera concertata. Inoltre, risulta evidente dallo studio di dati di letteratura che, quando gruppi di ricerca distinti studiano lo stesso sistema biologico, spesso le liste di singoli geni significativamente alterati che derivano da tali studi mostrano scarsa sovrapposizione. Infine, in molti casi non si identificano singoli geni che passino la soglia della significatività statistica, o perché le differenze biologiche sono modeste rispetto al rumore di fondo insito nella metodica dei microarrays, o per la bassa numerosità campionaria. Sfortunatamente, come tutti gli approcci basati sulla consultazione di database, il limite di questo tipo di analisi è dato dal fatto che non tutti i dati inseriti nei database di pubblico utilizzo vengono correttamente verificati: pertanto, il risultato relativo alle *pathways* arricchite nei due fenotipi tumorali non è stato di per sé utilizzato come punto di partenza per le successive analisi molecolari, ma è stato impiegato per porre in evidenza singoli miRNA di potenziale interesse.

L'analisi effettuata nel presente studio ha testato la significatività della distribuzione di elementi appartenenti ad un set di *pathways* cellulari modulate da miRNA sulla lista ordinata dei 353 miRNA analizzabili ordinati secondo la statistica del *t*-test.

Le informazioni riguardanti le *pathways* la cui regolazione ad opera dei miRNA è nota non sono facilmente ottenibili. Il database impiegato in questo studio è miRWalk, che dedica una sezione ad un elenco di *pathways* cellulari (selezionate a loro volta dai database KEGG e Biocarta) i cui componenti sono interessati da interazioni con miRNA sia dirette (in quanto target dei miRNA stessi) che indirette.

L'analisi GSEA ha messo in evidenza che, su 35 miRNA-*pathways* selezionate, 33 risultavano essere iperespresse negli adenomi paratiroidi sporadici, tra le quali due risultavano significative con un FDR (*false discovery rate*) inferiore al 25%: la *pathway* dell'oncosoppressore PTEN e quella della protein chinasi C (PKC). Tra le 2 su 35 *pathways* iperespresse nei carcinomi, solo una risultava significativamente alterata (FDR < 25%), ovvero la via di segnalazione intracellulare di *Sonic Hedgehog* (SHH).

Attraverso una ricerca bibliografica dei target (sia predetti *in silico* che verificati sperimentalmente) dei miRNA del *leading edge subset* (evidenziati in rosso nelle tabelle in Appendice) è stato selezionato per un ulteriore approfondimento miR-9.

MiR-9 è stato evidenziato tra i miRNA che interagiscono con molecole delle *pathways* di PKC e del gene oncosoppressore PTEN (che risultano essere significativamente iperespressi negli adenomi rispetto ai carcinomi). Questo miRNA, in particolare, si colloca all'undicesima posizione della lista che ordina i miRNA in base al loro livello decrescente di espressione negli adenomi rispetto ai carcinomi.

MiR-9, seguendo le indicazioni del database miRWALK, è collegato alla *pathway* di PKC a causa della sua interazione con NF-kB, un attivatore trascrizionale che può essere direttamente attivato da PKC ed è coinvolto nella patogenesi di molte neoplasie: infatti, con NF-kB può avere sia attività oncogenica che anti-tumorigenica (*Beneriah et al., 2011*).

L'interazione tra miR-9 e NF-kB è ormai nota e verificata sperimentalmente: miR-9, infatti, risulta downregolato in cellule di carcinoma ovarico, ed inibisce la crescita del carcinoma ovarico tramite la sua regolazione di NF-kB. In questo contesto, quindi, miR-9 sembrerebbe agire come miRNA oncosoppressore (*Guo et al., 2009*). La regolazione di NF-kB ad opera di miR-9 è stata osservata anche in uno studio (*Bazzoni et al., 2009*) condotto su monociti e neutrofili esposti a stimoli pro-infiammatori. Inoltre, i risultati di questo lavoro indicano la presenza di un *loop* autoregolatorio secondo il quale NF-kB è a sua volta capace di indurre l'espressione di miR-9.

Per quanto riguarda il collegamento con la via di segnalazione di PTEN, invece, il ruolo di miR-9 non è diretto: sembra infatti esistere una correlazione positiva tra il livello di espressione di miR-9 ed il livello di PTEN nel carcinoma a cellule squamose di testa e

collo (*Minor et al.,2012*). Al momento, tuttavia, non è ancora noto il meccanismo attraverso il quale questa azione regolatrice viene esercitata.

Oltre ai diversi target già validati sperimentalmente, miR-9 ha, come target predetto *in silico*, anche parafibromina. Infatti, sia MiRWALK che altri algoritmi di predizione di target dei miRNA lo identificano tra i molti putativi target di miR-9 a causa della complementarità della sua *seed sequence* con alcune sequenze presenti nella UTR all'estremità 3' del gene *CDC73*.

In letteratura non è presente alcun dato riguardo a miRNA che agiscano da inibitori dell'espressione di parafibromina; l'esistenza di meccanismi di inibizione mediati da miR-9 potrebbero spiegare il basso livello di espressione di parafibromina riscontrabile in alcuni casi di adenoma paratiroideo privi di mutazioni di *CDC73*: infatti, anche secondo l'esperienza del nostro gruppo di ricerca, l'immunoistochimica per parafibromina, eseguita su adenomi paratiroidi sporadici, evidenzia un'elevata variabilità nell'espressione della proteina tra campioni diversi; Per quanto riguarda la positività nucleare, infatti, fra gli adenomi l'immunoreattività varia dallo 0 % al 90%. E' quindi evidente che, oltre alle mutazioni di *CDC73*, in generalmente assenti negli adenomi paratiroidi sporadici, devono esistere meccanismi alternativi che portano alla riduzione dell'espressione di parafibromina.

Nel presente studio si è verificata *in vitro* l'azione inibitoria di miR-9, iperespresso negli adenomi rispetto ai carcinomi paratiroidi, sull'espressione di parafibromina.

Il primo approccio utilizzato per la validazione del target è stato l'utilizzo di un saggio di attività luciferasica per verificare l'interazione di miR-9 con la UTR in 3' del gene *CDC73*. Attraverso questo tipo di saggio, è stata evidenziata un'effettiva interazione tra miR-9 e la sequenza non codificante all'estremità 3' di *CDC73*. Infatti, è stato rilevato un decremento statisticamente significativo dell'attività luciferasica nelle cellule cotrasfettate con il precursore di miR-9 ed il plasmide codificante per la luciferasi (con l'UTR di *CDC73* clonata immediatamente a valle) rispetto alle cellule trasfettate con il solo plasmide. Tale decremento non era presente nelle cellule trasfettate con un miRNA che fungeva da controllo negativo.

Successivamente, si è verificato se la trasfezione del precursore di miR-9 in cellule HEK293A avesse effettivamente un ruolo inibitorio nell'espressione di parafibromina endogena.

Tramite *western blot*, è stato possibile osservare che, quarantotto ore dopo la trasfezione, alla più alta concentrazione utilizzata del precursore di miR-9 il livello di

espressione di parafibromina endogena diminuisce. Tale diminuzione non è presente nelle cellule trasfettate con il miRNA- controllo negativo.

Come già ampiamente discusso, parafibromina regola negativamente l'espressione di ciclina D1: tramite *western blot* si è dunque verificato se, indirettamente, la trasfezione con miR-9 potesse avere un effetto positivo sull'espressione di ciclina D1. Coerentemente con quanto atteso, alla diminuzione nel livello di espressione di parafibromina corrispondeva un aumento nell'espressione di ciclina D1. Questo effetto non è stato osservato nelle cellule trasfettate con il miR- controllo negativo.

La concordanza dei dati derivanti dal saggio dell'attività luciferasica e dal *western blot* in cellule trasfettate con miR-9 sembrano confermare che parafibromina sia un effettivo target di miR-9, validando quindi la predizione *in silico* ottenuta dalla consultazione del software MiRWALK.

Per quanto riguarda i tumori paratiroidi sporadici oggetto dello studio, è stata ricercata la presenza di una correlazione tra il livello di espressione di miR-9 nei singoli campioni, ottenuto dalla Real-time RT-PCR, ed il livello di espressione di parafibromina e ciclina D1 rilevato tramite immunohistochimica: non è stata tuttavia osservata alcuna correlazione tra questi parametri. Questo risultato non stupisce, data la numerosità dei fattori che concorrono a determinare il livello di espressione di una proteina *in vivo*; anche miR-9, a sua volta, può agire su moltissimi target diversi da parafibromina.

In conclusione, per quanto riguarda lo studio di miRNA nei tumori paratiroidi sporadici, il presente studio non ha evidenziato alcun miRNA differenzialmente espresso tra tumori benigni e maligni, secondo un classico approccio di analisi SAM. Per quanto riguarda la GSEA, si tratta del primo studio che considera questo tipo di analisi per i dati di miRNA-*profiling* sui tumori paratiroidi. Sembra doveroso sottolineare anche il principale limite di questo approccio, dato dal fatto che i dati riportati nei database impiegati per l'analisi delle *pathways* spesso non sono sottoposti ad un controllo. Tuttavia, i risultati della GSEA non sono stati considerati in relazione alle *pathways* evidenziate, ma solamente utilizzati come punto di partenza per evidenziare miRNA di possibile interesse. In quest'ottica, la nostra attenzione si è focalizzata su miR-9, collegato alle *pathways* di PKC e PTEN iper-rappresentate negli adenomi rispetto ai carcinomi e parte del *leading edge subset* in entrambe le vie.

La predizione *in silico* di parafibromina come target di miR-9 è apparsa subito interessante in virtù dello stretto legame tra *CDC73* e la tumorigenesi paratiroidea; la validazione *in vitro* effettuata in questo studio rappresenta il primo caso di

identificazione di un miRNA che interviene nella regolazione dell'espressione di parafibromina.

In sintesi, questo studio ha dimostrato per la prima volta la presenza di una mutazione somatica del gene *CDC73* in una forma sindromica di fibroma ossificante della mandibola e ha caratterizzato due nuovi meccanismi di inattivazione *CDC73*, ovvero la perdita di localizzazione nucleolare del prodotto proteico parafibromina e la sua *down*-regolazione da parte di un miRNA.

CAPITOLO 6

APPENDICE

A. Principali caratteristiche delle mutazioni missenso di *CDC73* note

Mutazione missenso	Nucleotide	Esoni	Tipo	Manifestazione clinica	Riferimento
p.Ala2Ser	c.4G>T	1	S	PA sporadico	<i>Cetani et al. 2007b</i>
p.Lys34Gln	c.100A>C	1	S	Tumore renale sporadico	<i>Zhao et al., 2007</i>
p.Ser59Phe	c.176C>T	2	G	PC sporadico	<i>Haven et al., 2007</i>
p.Ile60Asn	c.179T>A	2	S	OF in HPT-JT	<i>Presente studio</i>
p.Leu63Pro	c.188T>C	2	G	FIHP	<i>Masi et al., 2008</i>
p.Leu63Pro	c.188T>C	2	G	FIHP	<i>Newey et al., 2010</i>
p.Leu63Pro	c.188T>C	2	G	HPT-JT	<i>Newey et al., 2010</i>
p.Leu64Pro	c.191T>C	2	G	FIHP	<i>Howell et al., 2003</i>
p.Leu64Pro	c.191T>C	2	G	FIHP	<i>Villablanca et al., 2004</i>
p.Arg91Pro	c.272G>C	3	G	PA sporadico	<i>Cetani et al. 2007b</i>
p.Leu95Pro	c.284T>C	3	S	FIHP	<i>Bradley et al., 2006</i>
p.Leu95Pro	c.284T>C	3	G	HPT-JT	<i>Panicker et al., 2010</i>
p.Asn272Ser	c.815A4G	8	G	PA sporadico	<i>Juhlin et al., 2006</i>
p.Arg292Lys	c.875G>A	9	S	Tumore renale sporadico	<i>Zhao et al., 2007</i>
p.Asp379Asn	c.1135G>A	13	G	HPT-JT	<i>Bradley et al., 2006</i>

Tabella A1. Elenco delle mutazioni missenso di *CDC73* note; S:somatica; G:germinale; PA: adenoma paratiroideo; PC: carcinoma paratiroideo; OF: fibroma ossificante; FIHP: iperparatiroidismo familiare isolato.

Le differenti mutazioni missenso di *CDC73* fino ad oggi identificate sono in totale 11. Tra queste, alcune sono ricorrenti (Leu63Pro, Leu64Pro, Leu95Pro) in quanto sono state identificate in più soggetti. In 10 su 15 casi, le mutazioni missenso risultano essere germinali, mentre le rimanenti 5 sono state identificate a livello somatico: una di esse è stata riscontrata in un tumore paratiroideo sporadico benigno (Ala2Ser); due mutazioni erano presenti in tumori sviluppatasi nell'ambito di forme familiari di iperparatiroidismo (Ile60Asn, Leu95Pro) e due in tumori renali sporadici (Lys34Gln, Arg292Lys).

La mutazione P.Met1?, che interessa la metionina in posizione 1 di parafibromina (Bradley et al., 2002) porta probabilmente a una mancata traduzione proteica, e non è stata inclusa in questo elenco.

Solo 3 delle mutazioni identificate (Asn272Ser, Arg292Lys, Asp379Asn) interessano residui localizzati in domini di parafibromina a funzione nota, come la regione interessata all'interazione con altri componenti del complesso Paf1, compresa tra gli amminoacidi 227 e 413.

B. MiRNA collegati alla pathway di PKC

PROBE	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
hsa_miR_9	11	-2,132802248	0,2666078	Yes
hsa_miR_132	15	-1,917824507	0,52679145	Yes
hsa_miR_17	93	-0,465923667	0,3636775	No
hsa_miR_20b	99	-0,398215294	0,40471342	No
hsa_miR_130a	130	-0,175975338	0,34038335	No
hsa_miR_16	134	-0,147594109	0,35218987	No
hsa_miR_15a	141	-0,116637461	0,35075086	No
hsa_miR_29a	169	-0,011279359	0,27221477	No
hsa_miR_20a	171	-0,009309446	0,2705536	No
hsa_miR_23b	176	2,32E-04	0,25871676	No
hsa_let_7a	184	0,031323135	0,24234013	No
hsa_let_7i	191	0,070091628	0,23437038	No
hsa_miR_125b	228	0,286721349	0,1677747	No
hsa_miR_30b	235	0,3193672	0,19478025	No
hsa_miR_30c	262	0,476173431	0,18443976	No
hsa_miR_21	272	0,567718029	0,23738879	No

C. MiRNA collegati alla pathway di PTEN

PROBE	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
hsa_miR_519e	5	-2,962872744	0,051960625	Yes
hsa_miR_9	11	-2,132802248	0,084361285	Yes
hsa_miR_192	17	-1,71946013	0,10702187	Yes
hsa_miR_486_5p	30	-1,381103039	0,09670933	Yes
hsa_miR_144	35	-1,17446959	0,11009907	Yes
hsa_miR_7	36	-1,166825891	0,1375944	Yes
hsa_miR_548b_5p	41	-1,097172976	0,14916271	Yes
hsa_miR_335	42	-1,081991911	0,174659	Yes
hsa_miR_128	43	-1,060852528	0,19965714	Yes
hsa_miR_548n	44	-1,014012098	0,22355154	Yes
hsa_miR_93	52	-0,881297469	0,21931863	Yes
hsa_miR_181c	53	-0,862627327	0,23964576	Yes
hsa_miR_548m	54	-0,859680116	0,25990343	Yes
hsa_miR_199a_5p	63	-0,708468556	0,24802652	Yes
hsa_miR_497	64	-0,706842899	0,2646827	Yes
hsa_miR_375	67	-0,667932093	0,27327916	Yes
hsa_miR_548f	71	-0,64668119	0,2778034	Yes
hsa_miR_195	72	-0,62308681	0,29248595	Yes
hsa_miR_22	75	-0,607851028	0,2996666	Yes
hsa_miR_106b	77	-0,597372413	0,3101718	Yes
hsa_miR_107	87	-0,483706534	0,2894271	No
hsa_miR_17	93	-0,465923667	0,28254908	No
hsa_miR_363	96	-0,442879051	0,28584233	No
hsa_miR_20b	99	-0,398215294	0,2880831	No
hsa_miR_193a_3p	102	-0,385644823	0,29002768	No
hsa_miR_101	107	-0,33540833	0,2836456	No
hsa_miR_342_3p	115	-0,273399889	0,26508805	No
hsa_let_7e	117	-0,263537824	0,26772666	No
hsa_miR_25	118	-0,254184097	0,27371633	No
hsa_miR_200a	121	-0,22457841	0,2718655	No
hsa_miR_181a	124	-0,215738237	0,26980633	No

hsa_miR_34a	125	-0,211462691	0,27478927	No
hsa_miR_340	128	-0,182209983	0,27194005	No
hsa_miR_125a_5p	129	-0,181421816	0,2762151	No
hsa_miR_130a	130	-0,175975338	0,28036183	No
hsa_miR_16	134	-0,147594109	0,2731255	No
hsa_miR_15a	141	-0,116637461	0,25444537	No
hsa_miR_126	144	-0,095029436	0,24954182	No
hsa_miR_27a	151	-0,070089184	0,22976485	No
hsa_miR_26b	159	-0,053618018	0,20602831	No
hsa_miR_23a	170	-0,010143048	0,17055304	No
hsa_miR_20a	171	-0,009309446	0,1707724	No
hsa_miR_141	173	-0,001753492	0,1672423	No
hsa_miR_26a	180	0,022368314	0,14634082	No
hsa_let_7a	184	0,031323135	0,13636464	No
hsa_miR_183	186	0,037048396	0,13366623	No
hsa_miR_150	187	0,042289652	0,13466275	No
hsa_let_7b	188	0,056488603	0,13599387	No
hsa_let_7c	194	0,078453951	0,119985424	No
hsa_miR_200b	196	0,088235058	0,118493184	No
hsa_let_7f	203	0,153598353	0,10068404	No
hsa_miR_125a_3p	204	0,163216785	0,10453011	No
hsa_miR_29b	206	0,168944955	0,10493974	No
hsa_miR_139_5p	210	0,181128368	0,0984936	No
hsa_miR_100	211	0,186117589	0,102879316	No
hsa_miR_494	213	0,189478055	0,10377279	No
hsa_miR_143	218	0,239380628	0,09512789	No
hsa_miR_145	227	0,284576893	0,07326229	No
hsa_miR_125b	228	0,286721349	0,080018654	No
hsa_miR_378	230	0,297049522	0,083446965	No
hsa_miR_98	245	0,397872686	0,042822517	No
hsa_miR_374b	248	0,415240377	0,045464475	No
hsa_miR_19a	253	0,426983386	0,04124029	No
hsa_miR_30c	262	0,476173431	0,023889512	No
hsa_miR_302f	269	0,527813017	0,014898439	No
hsa_miR_21	272	0,567718029	0,02113341	No
hsa_miR_34b	292	0,857297301	-0,026522197	No
hsa_miR_133a	310	1,126446247	-0,060692664	No
hsa_miR_518f	312	1,156296253	-0,03701688	No
hsa_miR_202*	314	1,218145967	-0,011883658	No
hsa_miR_221	332	1,833551764	-0,029391741	No
hsa_miR_487b	334	1,850090623	0,010632759	No
hsa_miR_214	343	2,125319004	0,0321428	No

D. MiRNA collegati alla pathway di SHH

PROBE	RANK IN GENE LIST	RANK METRIC SCORE	RUNNING ES	CORE ENRICHMENT
hsa_miR_214	343	2,125319004	0,027190328	Yes
hsa_miR_202	340	2,078635693	-0,13861397	Yes
hsa_miR_196a	338	1,968022108	-0,30366474	Yes
hsa_miR_19a	253	0,426983386	-0,20901637	No
hsa_miR_575	237	0,341220081	-0,19822368	No
hsa_miR_378	230	0,297049522	-0,20768677	No
hsa_miR_125b	228	0,286721349	-0,22868411	No
hsa_miR_125a_3p	204	0,163216785	-0,1823811	No
hsa_miR_200b	196	0,088235058	-0,17443025	No
hsa_miR_429	192	0,074816078	-0,17250122	No
hsa_let_7b	188	0,056488603	-0,16948716	No
hsa_miR_141	173	-0,001753492	-0,13175859	No
hsa_miR_140_5p	166	-0,026575552	-0,11377348	No
hsa_miR_200c	140	-0,11722257	-0,04039359	No
hsa_miR_125a_5p	129	-0,181421816	-0,019660357	No
hsa_miR_181a	124	-0,215738237	-0,022244962	No
hsa_miR_200a	121	-0,22457841	-0,03364658	No
hsa_miR_660	112	-0,298024297	-0,027636098	No
hsa_miR_324_5p	104	-0,347017616	-0,030585367	No
hsa_miR_17	93	-0,465923667	-0,028432637	No
hsa_miR_663	74	-0,610182643	-0,011725091	No
hsa_miR_199b_5p	14	-1,972390413	0,1171852	No

CAPITOLO 7

BIBLIOGRAFIA

- Agarwal SK, Simonds WF, Marx SJ. The parafibromin tumor suppressor protein interacts with actin-binding proteins actinin-2 and actinin-3. *Mol Cancer*. 2008; 7:65.
- Bazzoni F, Rossato M, Fabbri M, Gaudiosi D, Mirolo M, Mori L, Tamassia N, Mantovani A, Cassatella MA, Locati M. Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(13):5282-7.
- Ben-Neriah Y, Karin M. Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. *Nat Immunol*. 2011;12(8):715-23.
- Blenkiron C, Goldstein LD, Thorne NP, Spiteri I, Chin SF, Dunning MJ, Barbosa-Morais NL, Teschendorff AE, Green AR, Ellis IO, Tavaré S, Caldas C, Miska EA. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol*. 2007;8(10):R214.
- Bradley KJ, Bowl MR, Williams SE, Ahmad BN, Partridge CJ, Patmanidi AL, Kennedy AM, Loh NY, Thakker RV. Parafibromin is a nuclear protein with a functional monopartite nuclear localization signal. *Oncogene*. 2007; 26(8):1213-21.
- Bradley KJ, Cavaco BM, Bowl MR, Harding B, Cranston T, Fratter C, Besser GM, Conceição Pereira M, Davie MW, Dudley N, Leite V, Sadler GP, Seller A, Thakker RV. Parafibromin mutations in hereditary hyperparathyroidism syndromes and parathyroid tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006; 64(3):299-306.
- Bradley KJ, Hobbs MR, Buley ID, Carpten JD, Cavaco BM, Fares JE, Laidler P, Manek S, Robbins CM, Salti IS, Thompson NW, Jackson CE, Thakker

RV. Uterine tumours are a phenotypic manifestation of the hyperparathyroidism-jaw tumour syndrome. *J Intern Med.* 2005; 257(1):18-26.

- Carpten JD, Robbins CM, Villablanca A, Forsberg L, Presciuttini S, Bailey-Wilson J, et al.,. HRPT2, encoding parafibromin, is mutated in hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome. *Nat Genet* 2002; 32:676–680.
- Cascón A, Huarte-Mendicoa CV, Javier Leandro-García L, Letón R, Suela J, Santana A, Costa MB, Comino-Méndez I, Landa I, Sánchez L, Rodríguez-Antona C, Cigudosa JC, Robledo M. Detection of the first gross CDC73 germline deletion in an HPT-JT syndrome family. *Genes Chromosomes Cancer.* 2011;50(11):922-9.
- Cavaco BM, Barros L, Pannett AA, Ruas L, Carvalheiro M, Ruas MM, Krausz T, Santos MA, Sobrinho LG, Leite V, Thakker RV. The hyperparathyroidism-jaw tumour syndrome in a Portuguese kindred. *QJM.* 2001; 94(4):213-22.
- Cetani F, Ambrogini E, Viacava P, Pardi E, Fanelli G, Naccarato AG, Borsari S, Lemmi M, Berti P, Miccoli P, Pinchera A, Marcocci C. Should parafibromin staining replace HRTP2 gene analysis as an additional tool for histologic diagnosis of parathyroid carcinoma? *Eur J Endocrinol.* 2007(a); 156(5):547-54.
- Cetani F, Pardi E, Ambrogini E, Viacava P, Borsari S, Lemmi M, Cianferotti L, Miccoli P, Pinchera A, Arnold A, Marcocci C. Different somatic alterations of the HRPT2 gene in a patient with recurrent sporadic primary hyperparathyroidism carrying an HRPT2 germline mutation. *Endocr Relat Cancer* 2007(b); 14:493–499.
- Cetani F, Pardi E, Borsari S, Viacava P, Dipollina G, Cianferotti L, Ambrogini E, Gazzero E, Colussi G, Berti P, Miccoli P, Pinchera A, Marcocci C. Genetic analyses of the HRPT2 gene in primary hyperparathyroidism: germline and somatic mutations in familial and sporadic parathyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(11):5583-91.

- Chan E, Prado DE, Weidhaas JB. Cancer microRNAs: from subtype profiling to predictors of response to therapy. *Trends Mol Med.* 2011;17(5):235-43.
- Corbetta S, Vaira V, Guarnieri V, Scillitani A, Eller-Vainicher C, Ferrero S, Vicentini L, Chiodini I, Bisceglia M, Beck-Peccoz P, Bosari S, Spada A. Differential expression of microRNAs in human parathyroid carcinomas compared with normal parathyroid tissue. *Endocr Relat Cancer.* 2010;17(1):135-46.
- Domingues R, Tomaz RA, Martins C, Nunes C, Bugalho MJ, Cavaco BM. Identification of the first germline HRPT2 whole-gene deletion in a patient with primary hyperparathyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2012;76(1):33-8.
- Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. *J Biomed Inform.* 2011;44(5):839-47.
- Emmott E, Hiscox JA. Nucleolar targeting: the hub of the matter. *EMBO Rep.* 2009;10(3):231-8.
- Farazi TA, Spitzer JI, Morozov P, Tuschl T. miRNAs in human cancer. *J Pathol.* 2011;223(2):102-15.
- Gill AJ, Clarkson A, Gimm O, Keil J, Dralle H, Howell VM, Marsh DJ. Loss of nuclear expression of parafibromin distinguishes parathyroid carcinomas and hyperparathyroidism-jaw tumor (HPT-JT) syndrome-related adenomas from sporadic parathyroid adenomas and hyperplasias. *Am J Surg Pathol.* 2006;30(9):1140-9.
- Gondivkar SM, Gadbail AR, Chole R, Parikh RV, Balsaraf S. Ossifying fibroma of the jaws: report of two cases and literature review. *Oral Oncol.* 2011;47(9):804-9.

- Guo LM, Pu Y, Han Z, Liu T, Li YX, Liu M, Li X, Tang H. MicroRNA-9 inhibits ovarian cancer cell growth through regulation of NF-kappaB1. *FEBS J.* 2009;5537-46.
- Hahn MA, Marsh DJ. Nucleolar localization of parafibromin is mediated by three nucleolar localization signals. *FEBS Lett.* 2007; 581(26):5070-4.
- Haven CJ, Wong FK, van Dam EW, van der Juijt R, van Asperen C, Jansen J, Rosenberg C, de Wit M, Roijers J, Hoppener J, Lips CJ, Larsson C, Teh BT, Morreau H. A genotypic and histopathological study of a large Dutch kindred with hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85(4):1449-54.
- Haven CJ, van Puijenbroek M, Tan MH, Teh BT, Fleuren GJ, van Wezel T, Morreau H. Identification of MEN1 and HRPT2 somatic mutations in paraffin-embedded (sporadic) parathyroid carcinomas. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007;67(3):370-6.
- Hemmer S, Wasenius VM, Haglund C, Zhu Y, Knuutila S, Franssila K, Joensuu H. Deletion of 11q23 and cyclin D1 overexpression are frequent aberrations in parathyroid adenomas. *Am J Pathol.* 2001;158(4):1355-62.
- Hobbs MR, Pole AR, Pidwirny GN, Rosen IB, Zarbo RJ, Coon H, Heath H 3rd, Leppert M, Jackson CE. Hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome: the HRPT2 locus is within a 0.7-cM region on chromosome 1q. *Am J Hum Genet.* 1999; 64(2):518-25.
- Hobbs MR, Rosen IB, Jackson CE. Revised 14.7-cM locus for the hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome gene, HRPT2. *Am J Hum Genet.* 2002; 70(5):1376-7.
- Howell VM, Gill A, Clarkson A, Nelson AE, Dunne R, Delbridge LW, Robinson BG, Teh BT, Gimm O, Marsh DJ. Accuracy of combined protein gene

product 9.5 and parafibromin markers for immunohistochemical diagnosis of parathyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 ;94(2):434-41

- Howell VM, Haven CJ, Kahnoski K, Khoo SK, Petillo D, Chen J, Fleuren GJ, Robinson BG, Delbridge LW, Philips J, Nelson AE, Krause U, Hammje K, Dralle H, Hoang-Vu C, Gimm O, Marsh DJ, Morreau H, Teh BT. HRPT2 mutations are associated with malignancy in sporadic parathyroid tumours. *J Med Genet.* 2003; 40(9):657-63
- Iacobone M, Masi G, Barzon L, Porzionato A, Macchi V, Ciarleglio FA, Palù G, De Caro R, Viel G, Favia G. Hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome: a report of three large kindred. *Langenbecks Arch Surg.* 2009;394(5):817-25.
- Iwata T, Mizusawa N, Taketani Y, Itakura M, Yoshimoto K. Parafibromin tumor suppressor enhances cell growth in the cells expressing SV40 large T antigen. *Oncogene.* 2007; 26(42):6176-83.
- Jackson CE, Norum RA, Boyd SB, Talpos GB, Wilson SD, Taggart RT, Mallette LE. Hereditary hyperparathyroidism and multiple ossifying jaw fibromas: a clinically and genetically distinct syndrome. *Surgery.* 1990; 108(6):1006-12
- Juhlin CC, Larsson C, Yakoleva T, Leibiger I, Leibiger B, Alimov A, Weber G, Höög A, Villablanca A. Loss of parafibromin expression in a subset of parathyroid adenomas. *Endocr Relat Cancer.* 2006; 13(2):509-23.
- Juhlin CC, Nilsson IL, Johansson K, Haglund F, Villablanca A, Höög A, Larsson C. Parafibromin and APC as screening markers for malignant potential in atypical parathyroid adenomas. *Endocr Pathol.* 2010;21(3):166-77.
- Juhlin CC, Haglund F, Villablanca A, Forsberg L, Sandelin K, Bränström R, Larsson C, Höög A. Loss of expression for the Wnt pathway components adenomatous polyposis coli and glycogen synthase kinase 3-beta in parathyroid carcinomas. *Int J Oncol.* 2009;34(2):481-92.

- Juhlin CC, Haglund F, Obara T, Arnold A, Larsson C, Höög A. Absence of nucleolar parafibromin immunoreactivity in subsets of parathyroid malignant tumours. *Virchows Arch.* 2011 ;459(1):47-53.
- Kelly TG, Shattuck TM, Reyes-Mugica M, Stewart AF, Simonds WF, Udelsman R, Arnold A, Carpenter TO. Surveillance for early detection of aggressive parathyroid disease: carcinoma and atypical adenoma in familial isolated hyperparathyroidism associated with a germline HRPT2 mutation. *J Bone Miner Res.* 2006;21(10):1666-71.
- Krebs LJ, Shattuck TM, Arnold A. HRPT2 mutational analysis of typical sporadic parathyroid adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(9):5015-7.
- Lee PK, Jarosek SL, Virnig BA, Evasovich M, Tuttle TM. Trends in the incidence and treatment of parathyroid cancer in the United States. *Cancer.* 2007;109(9):1736-41.
- Lin L, Czapiga M, Nini L, Zhang JH, Simonds WF. Nuclear localization of the parafibromin tumor suppressor protein implicated in the hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome enhances its proapoptotic function. *Mol Cancer Res.* 2007 ;5(2):183-93.
- Lin L, Zhang JH, Panicker LM, Simonds WF. The parafibromin tumor suppressor protein inhibits cell proliferation by repression of the c-myc protooncogene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:17420–17425.
- Lowery AJ, Miller N, Devaney A, McNeill RE, Davoren PA, Lemetre C, Benes V, Schmidt S, Blake J, Ball G, Kerin MJ. MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2009;11(3):R27.

- Masi G, Barzon L, Iacobone M, Viel G, Porzionato A, Macchi V, De Caro R, Favia G, Palu G. Clinical, genetic, and histopathologic investigation of CDC73-related familial hyperparathyroidism. *Endocr Relat Cancer* 2008;15:1115–1126.
- Meister J, Schmidt MH. miR-126 and miR-126*: new players in cancer. *Scientific World Journal*. 2010;10:2090-100.
- Minor J, Wang X, Zhang F, Song J, Jimeno A, Wang XJ, Lu X, Gross N, Kulesz-Martin M, Wang D, Lu SL. Methylation of microRNA-9 is a specific and sensitive biomarker for oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*. 2012;48(1):73-8.
- Mosimann C, Hausmann G, Basler K. Parafibromin/Hyrax activates Wnt/Wg target gene transcription by direct association with beta-catenin/Armadillo. *Cell*. 2006; 125(2):327-41.
- Mosimann C, Hausmann G, Basler K. The role of Parafibromin/Hyrax as a nuclear Gli/Ci-interacting protein in Hedgehog target gene control. *Mech Dev*. 2009;126(5-6):394-405.
- Mueller CL, Porter SE, Hoffman MG, Jaehning JA. The Paf1 complex has functions independent of actively transcribing RNA polymerase II. *Mol Cell*. 2004; 14(4):447-56.
- Newey PJ, Bowl MR, Thakker RV. Parafibromin--functional insights. *J Intern Med*. 2009;266(1):84-98.
- Newey PJ, Bowl MR, Cranston T, Thakker RV. Cell Division Cycle Protein 73 Homolog (CDC73) Mutations in the Hyperparathyroidism-Jaw Tumor Syndrome (HPT-JT) and Parathyroid Tumors. *Hum Mutat*. 2010;31(3):295-307.
- Ono A, Tsukamoto G, Nagatsuka H, Yoshihama Y, Rivera RS, Katsurano M, Yao M, Sasaki A. An immunohistochemical evaluation of BMP-2, -4, osteopontin, osteocalcin and PCNA between ossifying fibromas of the jaws and

peripheral cemento-ossifying fibromas on the gingiva. *Oral Oncol.* 2007;43(4):339-44.

- Panicker LM, Zhang JH, Dagur PK, Gastinger MJ, Simonds WF. Defective nucleolar localization and dominant interfering properties of a parafibromin L95P missense mutant causing the hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome. *Endocr Relat Cancer.* 2010;17(2):513-24.
- Pimenta FJ, Gontijo Silveira LF, Tavares GC, Silva AC, Perdigão PF, Castro WH, Gomez MV, Teh BT, De Marco L, Gomez RS. HRPT2 gene alterations in ossifying fibroma of the jaws. *Oral Oncol.* 2006 Aug;42(7):735-9.
- Porzionato A, Macchi V, Barzon L, Masi G, Iacobone M, Parenti A, Palù G, De Caro R. Immunohistochemical assessment of parafibromin in mouse and human tissues. *J Anat.* 2006; 209(6):817-27.
- Rahbari R, Holloway AK, He M, Khanafshar E, Clark OH, Kebebew E. Identification of differentially expressed microRNA in parathyroid tumors. *Ann Surg Oncol.* 2011;18(4):1158-65.
- Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc.* 2010;5(4):725-38.
- Shattuck TM, Välimäki S, Obara T, Gaz RD, Clark OH, Shoback D, Wierman ME, Tojo K, Robbins CM, Carpten JD, Farnebo LO, Larsson C, Arnold A. Somatic and germ-line mutations of the HRPT2 gene in sporadic parathyroid carcinoma. *N Engl J Med.* 2003;349(18):1722-9.
- Schwarz JM, Rödelsperger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods.* 2010 Aug;7(8):575-6.
- Sempere LF, Christensen M, Silahtaroglu A, Bak M, Heath CV, Schwartz G, Wells W, Kauppinen S, Cole CN. Altered MicroRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer. *Cancer Res.* 2007;67(24):11612-20.

- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(43):15545-50.
- Szabó J, Heath B, Hill VM, Jackson CE, Zarbo RJ, Mallette LE, Chew SL, Besser GM, Thakker RV, Huff V, et al. Hereditary hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome: the endocrine tumor gene HRPT2 maps to chromosome 1q21-q31. *Am J Hum Genet*. 1995; 56(4):944-50.
- Takahashi A, Tsutsumi R, Kikuchi I, Obuse C, Saito Y, Seidi A, Karisch R, Fernandez M, Cho T, Ohnishi N, Rozenblatt-Rosen O, Meyerson M, Neel BG, Hatakeyama M. SHP2 tyrosine phosphatase converts parafibromin/Cdc73 from a tumor suppressor to an oncogenic driver. *Mol Cell*. 2011;43(1):45-56.
- Tan MH, Morrison C, Wang P, Yang X, Haven CJ, Zhang C, Zhao P, Tretiakova MS, Korpi-Hyövalti E, Burgess JR, Soo KC, Cheah WK, Cao B, Resau J, Morreau H, Teh BT. Loss of parafibromin immunoreactivity is a distinguishing feature of parathyroid carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(19):6629-37.
- Teh BT, Farnebo F, Twigg S, Höög A, Kytölä S, Korpi-Hyövähti E, Wong FK, Nordenström J, Grimelius L, Sandelin K, Robinson B, Farnebo LO, Larsson C. Familial isolated hyperparathyroidism maps to the hyperparathyroidism-jaw tumor locus in 1q21-q32 in a subset of families. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; 83(6):2114-20.
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Apr 24;98(9):5116-21.
- Villablanca A, Calender A, Forsberg L, Höög A, Cheng JD, Petillo D, Bauters C, Kahnoski K, Ebeling T, Salmela P, Richardson AL, Delbridge L, Meyrier A, Proye C, Carpten JD, Teh BT, Robinson BG, Larsson C. Germline and de novo

mutations in the HRPT2 tumour suppressor gene in familial isolated hyperparathyroidism (FIHP). *J Med Genet.* 2004; 41(3):e32.

- Wang P, Bowl MR, Bender S, Peng J, Farber L, Chen J, Ali A, Zhang Z, Alberts AS, Thakker RV, Shilatifard A, Williams BO, Teh BT. Parafibromin, a component of the human PAF complex, regulates growth factors and is required for embryonic development and survival in adult mice. *Mol Cell Biol* 2008;28:2930–2940.
- Wassif WS, Farnebo F, Teh BT, Moniz CF, Li FY, Harrison JD, Peters TJ, Larsson C, Harris P. Genetic studies of a family with hereditary hyperparathyroidism-jaw tumour syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1999; 50(2):191-6.
- Woodard GE, Lin L, Zhang JH, Agarwal SK, Marx SJ, Simonds WF. Parafibromin, product of the hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome gene HRPT2, regulates cyclin D1/PRAD1 expression. *Oncogene* 2005;24:1272–1276.
- Yang YJ, Han JW, Youn HD, Cho EJ. The tumor suppressor, parafibromin, mediates histone H3 K9 methylation for cyclin D1 repression. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(2):382-90.
- Zhang JH, Panicker LM, Seigneur EM, Lin L, House CD, Morgan W, Chen WC, Mehta H, Haj-Ali M, Yu ZX, Simonds WF. Cytoplasmic polyadenylation element binding protein is a conserved target of tumor suppressor HRPT2/CDC73. *Cell Death Differ.* 2010;17(10):1551-65.
- Zhao J, Yart A, Frigerio S, Perren A, Schraml P, Weisstanner C, Stallmach T, Krek W, Moch H. Sporadic human renal tumors display frequent allelic imbalances and novel mutations of the HRPT2 gene. *Oncogene.* 2007;26(23):3440-9.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare sentitamente il mio Supervisore, Prof.ssa Luisa Barzon, ed il Direttore della Scuola di Dottorato in Biomedicina, Prof. Giorgio Palù.

Ringrazio anche tutti coloro che hanno contribuito a questo lavoro:

Il Prof. Ignazio Castagliuolo , la Dr.ssa Barbara Mantelli e il Dr. Alessandro Sinigaglia (Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche)

Il Prof. Maurizio Iacobone (Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Gastroenterologiche)

Il Dr. Stefano Toppo (Dipartimento di chimica Biologica)

Il Prof. Andrea Porzionato, la Dr.ssa Gloria Sarasin e la Dr.ssa Anna Rambaldo (Dipartimento di Anatomia e Fisiologia Umana)

Le Dr.sse Barbara Di Camillo e Tiziana Sanavia (Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione)