



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI**

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE  
BIOMEDICHE**

*Coordinatore della Scuola: Prof. Andrea Fausto Piana*

**INDIRIZZO IN EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE DEI TUMORI**

*Responsabile di indirizzo: Prof.ssa Rosa Maria Pascale*

**XXVIII CICLO**

**MATURAZIONE DEI microRNA:**

**EFFETTO SULLA REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA**

**NELL'EPATOCANCEROGENESI UMANA**

***Direttore:***

Prof. Andrea Fausto Piana

***Tutor:***

Dott.ssa Maria Antonietta Seddaiu

***Tesi di dottorato di:***

Dott.ssa Elisa Barattini

**Anno Accademico 2014 - 2015**

*Desidero ricordare tutti coloro che mi hanno aiutato nella stesura della tesi con suggerimenti, critiche ed osservazioni: a loro va la mia gratitudine.*

*Ringrazio anzitutto la Professoressa Pascale e la Dottoressa Seddaiu che mi hanno guidato con perizia durante tutta la stesura della tesi. Ringrazio inoltre la Dott.ssa Daino e la Prof.ssa Simile per avermi sostenuto e incoraggiato.*

*In particolare, voglio rivolgere un ringraziamento speciale al Professor Calvisi che ha sempre mostrato gentilezza e disinteressata disponibilità; il Professor Terracciano, che mi ha ospitato durante i sei mesi di stage e che, nonostante i diversi impegni da responsabile, ha sempre trovato il tempo per ascoltarmi, consigliarmi e fornirmi insegnamenti preziosi per il mio futuro Professionale; la Dott.ssa Quintavalle per la sua disponibilità.*

*Un ringraziamento particolare va alla mia famiglia: mia madre Maria Lucia, mio padre Guido e mia sorella Renata, i quali mi hanno supportato moralmente nei momenti difficili.*

*Inoltre ho il piacere di ringraziare i colleghi e gli amici che mi hanno incoraggiato o che hanno speso parte del proprio tempo per leggere e discutere con me le bozze del lavoro.*

*Vorrei infine ringraziare una delle persone a me più care: il mio fidanzato, a cui questo lavoro è dedicato*

|                                                                                 |       |
|---------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <b>INDICE GENERALE</b>                                                          | pg. 3 |
| <b>ABSTRACT</b>                                                                 | pg. 5 |
| <b><u>SEZIONE COMPILATIVA</u></b>                                               |       |
| <b>1. INTRODUZIONE</b>                                                          | pg. 7 |
| 1.1.1. miRNA                                                                    | pg. 7 |
| 1.1.2. Ruolo fisiologico dei miRNA                                              | pg. 8 |
| 1.2. I miRNA nelle patologie umane                                              | pg.10 |
| 1.3. Maturazione dei miRNA e la loro espressione                                | pg.15 |
| 1.3.1. Biogenesi dei miRNA                                                      | pg.16 |
| 1.3.2. Il microprocessore                                                       | pg.21 |
| 1.3.3. Exportina-5                                                              | pg.24 |
| 1.3.4. Dicer                                                                    | pg.25 |
| 1.3.5. Argonauta 2                                                              | pg.28 |
| 1.4. miRNA e patologie                                                          | pg.29 |
| 1.4.2. miRNA nelle patologie epatiche                                           | pg.30 |
| 1.5. miRNA e HCC                                                                | pg.35 |
| 1.5.2. Fattori di rischio dell'HCC                                              | pg.36 |
| 1.5.3. miRNA nell'HCC                                                           | pg.38 |
| <b><u>SEZIONE SPERIMENTALE</u></b>                                              |       |
| <b>2. SCOPO DELLA RICERCA</b>                                                   | pg.41 |
| <b>3. MATERIALI E METODI</b>                                                    | pg.42 |
| 3.1. Campioni utilizzati                                                        | pg.42 |
| 3.2. Tecniche utilizzate                                                        | pg.42 |
| 3.2.1. Preparazione istologica                                                  | pg.42 |
| 3.2.2. Raccolta dati clinici e istopatologici dei pazienti inclusi nello studio | pg.42 |
| 3.3. Analisi statistica                                                         | pg.47 |
| <b>4. RISULTATI</b>                                                             | pg.49 |
| 4.1. Analisi istologica                                                         | pg.49 |
| 4.2. Analisi molecolare                                                         | pg.53 |

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

**5. CONCLUSIONI**

pg.73

**6. BIBLIOGRAFIA**

pg.76

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

## ABSTRACT

**Aim:** microRNAs (miRNAs), short (19-25 nt), endogenous, non-coding, single-stranded RNA molecules, are able to regulate gene expression at post-transcriptional level by binding to 3'-UTR or 5'-UTR or coding region. miRNAs are usually transcribed, in nucleus, by RNA polymerase II (and some by RNA polymerase III) as long primary immature miRNAs (pri-miRNAs). The pri-miRNAs are cleaved in short transcripts, the pre-miRNA (<100 bp), by a complex called Microprocessor formed by Drosha and DGCR8. The pre-miRNAs (70-110 nt) are therefore exported into the cytoplasm by Exportin-5, where they are further processed by Dicer in mature miRNA (20-25 nt). Only single strand of the mature miRNA is incorporated into the RISC complex involved in gene silencing. miRNAs play an important role in the proliferation, differentiation, migration, apoptosis, control of the cell cycle and cell metabolisms through modulating mRNA stability.

miRNAs may play a role in human diseases, for example tumors as hepatocellular carcinoma (HCC). It's important therefore to study the expression of genes involved in miRNA synthesis and maturation (Drosha, DGCR8, Exportin-5 and Dicer).

**Methods:** We use normal and cancer liver tissues from patients who have given their consensus. We analyzed histo-pathologically liver cancer samples from HCC tissues and in the corresponding adjacent noncancerous liver tissues. We performed real time qRT-PCR to evaluate and quantify the expression of Drosha, DGCR8, Exportin-5 and Dicer genes.

**Results:** We found that Drosha, DGCR8, exportin-5 and Dicer were up-regulated in all neoplastic tissue samples tested, compared to normal value.

**Conclusions:** Our results suggest that Drosha, DGCR8, Exportin-5 and Dicer could be involved directly or indirectly in the development of HCC or in its progression.

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

# SEZIONE COMPILATIVA

## 1. INTRODUZIONE

### 1.1. miRNA

I trascritti di RNA comprendono RNA messaggeri e RNA non codificanti. Questi ultimi sono divisi in due categorie principali: piccoli RNA non codificanti (<200 nucleotidi) e lunghi RNA non codificanti (lncRNA, >200 nucleotidi). Alcuni piccoli RNA non codificanti, gli RNA *housekeeping*, come rRNA e tRNA, sono essenziali per la fisiologia della cellula (1). Un altro gruppo di piccoli RNA controllano negativamente l'espressione del materiale genetico indesiderato e sono presenti in tutti gli organismi eucarioti. In base alla loro lunghezza (20-30 nucleotidi) e all'associazione con proteine della famiglia Argonauta (AGO), i piccoli RNA sono stati classificati in tre classi: miRNA, siRNA e piRNA (2) (**Tabella 1**).

I miRNA e i siRNA sono simili sia dal punto di vista biochimico che funzionale: entrambi sono lunghi 19-20 nucleotidi (nt); hanno un'estremità 5'-fosfato e una 3'-idrossile e sono parte del complesso di spegnimento indotto dall'RNA (RISC) al fine di inibire l'espressione di uno specifico gene. Queste molecole si distinguono per la loro origine: i miRNA derivano da una regione a doppio filamento lunga 60-70 nt, mentre i siRNA da lunghi RNA a doppio filamento (3).

I miRNA sono piccole molecole endogene non codificanti lunghe circa 21 nucleotidi, filogeneticamente molto conservate (4), individuate inizialmente nel nematode *Caenorhabditis elegans* nel 1993 (5). Sono molecole in grado di regolare negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale, legandosi alla regione 3'UTR (regione non tradotta) o alla regione codificante ORF o alla regione 5'UTR del mRNA bersaglio. Il legame a questi ultimi due siti risulta essere meno efficiente e meno frequente rispetto al primo (4).

I microRNA presentano un suffisso "miR" seguito da un numero di identificazione univoco (ad esempio miR-1, miR-2 ecc). I geni che codificano i miRNA hanno lo

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

stesso prefisso del miRNA corrispondente ma scritto con lettere maiuscole. I numeri identificativi sono assegnati sequenzialmente. Ortologi simili possono avere lo stesso numero e ciò è a discrezione del ricercatore, ad esempio, miR-1 di *Drosophila* differisce di un solo nucleotide da miR-1 di *C. elegans* o da quello dell'uomo (6). Alle sequenze paraloghe, in cui il miRNA maturo differisce di solo una o due posizioni, sono assegnati dei suffissi con le lettere, ad esempio miR-10a e miR-10b. Distinti loci presenti nel *hairpin* possono dar luogo a miRNA maturi identici, distinti da suffissi numerici, ad esempio miR-281-1 e miR-281-2. Le sequenze mature sono designate "miR" nel *database*, mentre i corrispettivi precursori a forcina "mir". Il suffisso -3p o -5p, che a volte segue il nome del miR, indica il braccio maturo da cui deriva (7).

### 1.1.2. Ruolo fisiologico dei miRNA

I microRNA sono presenti negli animali, nelle piante e in alcuni virus (8). Ad esempio, il virus oncogenico *Epstein Barr* è in grado di codificare alcuni miRNA, come BART-6-3p (9).

Il ruolo fisiologico dei miRNA è stato messo in evidenza nei modelli di topo Knockout. Questi topi presentano una carenza di due enzimi fondamentali per la biogenesi dei miRNA: Dicer e DGCR8.

L'assenza della biogenesi dei miRNA porta a letalità embrionale. I miRNA sono spesso richiesti per il mantenimento dell'omeostasi (ad es. la deficienza di miR-208 negli animali porta a difetti nella risposta a stress e a un'ipertrofia cardiaca) e per la differenziazione dei tessuti. Mediante studi di iper-espressione, si è scoperto che i miRNA sono coinvolti in numerosi aspetti della funzione neuronale, tra cui il rimodellamento dello sviluppo, lo sviluppo della memoria dipendente dall'amigdala, lo sviluppo delle fibre dendritiche e la sopravvivenza delle cellule neuronali post-mitotiche. Inoltre, regolano la funzione di molte cellule ematopoietiche come i neutrofili, i linfociti, gli eritrociti e i megacariociti (10).

I miRNA sono in grado di modulare la concentrazione di molte proteine regolatorie necessarie per il normale sviluppo e funzione del sistema immunitario. Possono ad es.

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

influenzare diverse vie metaboliche che controllano lo sviluppo e la funzione dell'immunità innata. miR-21 e miR-196 possono bloccare *in vitro* la granulopoiesi, mentre miR-155 può incrementare *in vivo* il numero dei granulociti immaturi. I miRNA, oltre a regolare lo sviluppo dei granulociti, possono regolarne la loro funzione. miR-223 regola negativamente sia la proliferazione che l'attivazione dei neutrofili. Il deficit di questo miRNA nei neutrofili aumenta la capacità di subire *burst* ossidativo. Molti fattori coinvolti nella monocitopoiesi sono regolati o regolano, a loro volta, specifici miRNA come ad esempio anche RUNX1, noto come AML1, il quale si lega alle regioni del promotore di miR-17-92 e miR-106a-92, inibendone l'espressione.

| CARATTERISTICHE                    | miRNA                                           | siRNA                                                                               | piRNA                                                                                                                                          |
|------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Lunghezza                          | ~22 nucleotidi                                  | ~21 nucleotidi                                                                      | 24-30 nucleotidi                                                                                                                               |
| Enzimi coinvolti nella maturazione | Drosha e Dicer                                  | Dicer                                                                               | Zucchini e enzimi accessori sconosciuti                                                                                                        |
| sottogruppi AGO                    | AGO                                             | AGO                                                                                 | PIWI                                                                                                                                           |
| Meccanismo di azione               | -repressione traduzionale<br>-degradazione mRNA | clivaggio del RNA                                                                   | -repressione trascrizionale o post-trascrizionale dei trasposoni<br>-fenomeni multigenerazionali epigenetici nei vermi                         |
| Funzione                           | regolazione dei geni che codificano proteine    | -regolazione dei geni che codificano proteine<br>e trasposoni<br>-difesa antivirale | -piRNA nel pre-pachitene: spegnimento dei trasposoni<br>-piRNA nel pachitene: sconosciuta<br>-piccoli RNA simili a piRNA nel soma: sconosciuta |

**Tab.1** Classificazione di small RNA [modificata da Ha M, Kim VN, 2014, (2)]

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

Per quanto riguarda l'immunità adattativa, il complesso proteico che controlla lo sviluppo delle cellule T nel timo e la loro attivazione in periferia, è controllato dai miRNA. La delezione specifica di Dicer nelle cellule T ha messo in evidenza la sua importanza nello sviluppo delle cellule T mature.

Il cluster miR17-92 aumenta la sopravvivenza delle cellule T durante lo sviluppo (11). Inoltre questo cluster potrebbe giocare un ruolo nella lipogenesi e nelle malattie cardiometaboliche ed essere un utile controllo positivo in pazienti obesi o con malattie cardiovascolari (CVD) per gli studi basati sul plasma/esosoma (12). Invece per quanto riguarda le cellule B, la loro differenziazione è sotto il controllo di miR-150, un miRNA espresso nei linfociti maturi, che regola l'espressione di c-Myc, un fattore di trascrizione coinvolto in molteplici fasi dello sviluppo dei linfociti (13).

## **1.2. I miRNA nelle patologie umane**

L'elevato numero di geni bersaglio suggerisce che i miRNA siano coinvolti nel controllo di diversi processi biologici quali la proliferazione, la differenziazione (14), la migrazione, l'apoptosi, il controllo del ciclo cellulare (15), la repressione della replicazione del virus HBV (16), la regolazione del colesterolo (17) e del metabolismo degli acidi grassi (18), il controllo della risposta immune innata e adattativa (19), e l'autofagia (20). I miRNA possono comportarsi da oncosoppressori o da oncogeni (oncomiR), questo dipende dal mRNA bersaglio con cui si legano (21): possono ridurre l'espressione di geni oncosoppressori, comportandosi come oncogeni (onco-miRNA) o agire su trascritti mRNA oncogenici, comportandosi come oncosoppressori. Ad esempio l'inibizione dell'espressione di miR-21 incrementa l'espressione dell'oncosoppressore PTEN (22), che attiva la via della fosfatidilinositolo-3 chinasi, PI3K. L'attivazione di questa via incrementa l'attività di AKT chinasi che fosforila mTOR (il bersaglio mammifero della rapamicina). L'attivazione di mTOR è associata alla resistenza alla chemioterapia e alla

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

radioterapia. PTEN è iporegolato nel fegato e la sua repressione è associata al comportamento biologico aggressivo e a una scarsa sopravvivenza dei pazienti (22).

Poiché i microRNA controllano diversi processi fisiologici quali il metabolismo, l'apoptosi, la proliferazione cellulare, la divisione delle cellule staminali, la differenziazione muscolare e la morfogenesi del cervello, le aberrazioni nella loro espressione sono correlate ad una varietà di patologie che vanno dai tumori alle malattie autoimmuni (23). Nel 2008 sono stati identificati diversi miRNA presenti nel circolo sanguigno, nelle piastrine, nei leucociti e negli eritrociti. I miRNA presenti nel plasma sono stabili anche in condizioni avverse, quali pH alto o basso, ciclo di congelamento-scongelo e conservazione a lungo termine a temperatura ambiente, perché confinati all'interno di esosomi, di microvescicole e di corpi apoptotici o perché associati a proteine che legano RNA (come le proteine Argonata 2) o a complessi di lipoproteine (HDL), per proteggersi dalla degradazione ad opera delle RNAsi. I miRNA potrebbero essere marcatori ideali in diverse patologie in quanto non richiedono analisi invasive, sono a basso costo, specifici e quantizzabili.

Le malattie cardiovascolari (CVD) rappresentano la principale causa di morte nel mondo, per cui è necessario identificare dei fattori molecolari alla base di tali patologie. Fino ad oggi per identificare e monitorare i danni cardiaci sono stati utilizzati biomarcatori proteici, come la troponina cardiaca (cTn), il CK-MB, il peptide natriuretico cerebrale (BNP) e il pro-ormone N-terminale (NT-proBNP). Questi biomarcatori per quanto utili non rappresentano la soluzione ideale in quanto forniscono anche falsi positivi; è necessario pertanto ricercarne altri che rispondano ai criteri propri di un biomarcatore specifico (oppure che rispondano ai classici criteri di specificità). Questi potrebbero essere rappresentati proprio dai miRNA in quanto è noto il ruolo importante svolto da essi nell'infarto miocardico acuto (AMI), nell'ipertrofia, nello scompenso cardiaco, nelle aritmie e nell'aterosclerosi. Nel sangue, miR-423-5p è altamente espresso in pazienti con scompenso cardiaco (indipendentemente da età e sesso) e potrebbe rappresentare un biomarcatore significativo e sensibile per le malattie cardiache. Recentemente è stato riportato che

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

elevati livelli plasmatici di questo miRNA sono correlati positivamente con i livelli del frammento N-terminale del propeptide natriuretico di tipo B (NT-proBNP) in pazienti con cardiomiopatia dilatativa.

I miRNA miR-1, miR-16, miR-26a e miR-133a permettono di distinguere i pazienti con sindrome tako-tsubo (o cardiomiopatia da stress o sindrome del cuore infranto) dai pazienti con AMI e da quelli sani.

I miRNA sono implicati anche nel diabete mellito di tipo 1, di tipo 2 e gestazionale. I miR-21 e miR-210 circolanti sono significativamente alti nel plasma e nelle urine dei pazienti diabetici di tipo 1, mentre miR-126 è notevolmente più basso nelle urine di pazienti con diabete di tipo 1. Sono stati trovati alti livelli di miR-29a nelle urine di pazienti con albuminuria con DM di tipo 2 rispetto ai controlli sani; inoltre miR-29b urinario è correlato, in pazienti con diabete di tipo 2, con lo spessore dell'intima-media carotidea (cIMT). I livelli di miR-223 e miR-146a nel plasma e nelle piastrine sono significativamente ridotti nei pazienti con ictus ischemico e DM o solo DM.

I pazienti HIV-1 presentano nel plasma alti livelli di miR-29b, mentre bassi livelli plasmatici di miR-29c indicano alta viremia, bassa conta di cellule T CD4+ e alti livelli di DNA HIV-1 integrato, suggerendo che la famiglia di questi miRNA sia implicata nell'infezione da HIV-1. Infine alti livelli di miR-122 extracellulare sono espressi in pazienti co-infetti da HIV e HCV.

Livelli anomali di miRNA extracellulari sono stati riscontrati in diverse neoplasie, ematologiche e solide (**Tabella 2**).

| Cancer type              | miRNA                                                                | Source      | Expression   | Significance                                                                                                                           | Reference |
|--------------------------|----------------------------------------------------------------------|-------------|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Hematological cancer     | miR-21                                                               | Serum       | lper         | Diagnosis of DLBCL disease                                                                                                             | (21)      |
|                          | miR-150, miR-342                                                     | Plasma      | lper         | AML vs. healthy controls                                                                                                               | (22)      |
|                          | miR-155                                                              | Plasma      | lper         | CLL vs. healthy controls                                                                                                               | (23)      |
| Lung cancer              | miR-25, miR-223                                                      | Serum       | lper         | Diagnosis of NSCLC disease                                                                                                             | (15)      |
|                          | miR-1254, miR-574-5p                                                 | Serum       | lper         | Diagnosis of early stage NSCLC patients vs. controls                                                                                   | (24)      |
| Prostate                 | miR-155, miR-197, miR-182                                            | Plasma      | lper         | Diagnosis of in stage-I NSCLC disease                                                                                                  | (25)      |
|                          | miR-375, miR-141                                                     | Plasma      | Down         | PCa patient vs. BPH controls                                                                                                           | (26)      |
|                          | miR-107, miR-574-3P                                                  | Urine       | lper         | PCa vs. healthy controls                                                                                                               | (27)      |
|                          | miR-205, miR-214                                                     | Urine       | Down         | PCa vs. healthy controls                                                                                                               | (28)      |
| Pancreatic               | Index I (4 miRNAs) and Index II (10 miRNAs)                          | Whole blood | Differential | Early detection of pancreatic cancer vs. healthy controls                                                                              | (29)      |
| Hepatocellular carcinoma | miR-16, miR-199a                                                     | Serum       | Down         | HCC vs. chronic liver disease. miR-16 with AFP and AFP-L3 tumor protein markers increased sensitivity and specificity of HCC diagnosis | (30)      |
|                          | miR-15b, miR-130b, and miR-16                                        | Serum       | lper         | HCC discriminate HBV hepatitis patients, and also sensitive rather than other tumor biomarkers for diagnosis of HCC                    | (31, 32)  |
|                          | miR-625, miR-618, miR-532, miR-650, miR-516-5p                       | Urine       | Differential | HCC (HCV positive) group vs. healthy controls                                                                                          | (33)      |
| Colorectal cancer        | miR-29a, miR-92, miR-601, miR-760                                    | Plasma      | Differential | Early diagnosis of CRC vs. healthy controls                                                                                            | (34, 35)  |
|                          | miR-31, miR-181b, miR-92, miR-203 and miR-21, let-7g                 | Serum       | Differential | Good biomarkers for diagnostic of CRC compared with single protein biomarkers                                                          | (36)      |
|                          | miR-200c                                                             | Serum       | lper         | Diagnosis of CRC lymph node metastasis                                                                                                 | (37)      |
| Gastric cancer           | miR-18a                                                              | Plasma      | lper         | GC vs. healthy controls                                                                                                                | (38)      |
|                          | miR-122, miR-192                                                     | Plasma      | Differential | Diagnosis of distant metastasis in GC disease                                                                                          | (39)      |
| Ovarian cancer           | miR-205, miR-let-7f                                                  | Plasma      | Differential | Epithelial ovarian cancers (EOC) vs. healthy controls                                                                                  | (40)      |
| Esophageal               | miR-21                                                               | Serum       | lper         | Esophageal cancer and BTC vs. controls                                                                                                 | (41, 42)  |
| Cervical                 | miR-218                                                              | Serum       | Down         | Diagnosis of cervical adenocarcinoma and lymphatic metastasis                                                                          | (43)      |
| Thyroid                  | let-7f, miR-151-5p, miR-222                                          | Serum       | lper         | Diagnosis of papillary thyroid cancer (PTC)                                                                                            | (44)      |
| Astrocytomas             | miR-15b*, miR-23a, miR-133a, miR-150*, miR-197, miR-497, miR-548b-5p | Serum       | Down         | Diagnosis of malignant astrocytomas with specificity and sensitivity                                                                   | (45)      |
| Head and neck            | miR-125a, miR-200a                                                   | Saliva      | Down         | Oral squamous cell carcinoma patients vs. control subjects                                                                             | (46)      |
| Bladder                  | miR-125b and miR-126                                                 | Urine       | Differential | Diagnosis of bladder cancer                                                                                                            | (46)      |

PCa, prostate cancer; BPH, benign prostatic hyperplasia; HCC, hepatocellular carcinoma; CRC, colorectal cancer; GC, gastric cancer; BTC, biliary tract cancer.

**Tab.2** miRNA circolanti come potenziali biomarcatori nei tumori umani [modificata da Omar Faruq and Andrea Vecchione, 2015, (23)]

Sono oggi noti diversi miRNA la cui espressione è significativamente alterata nei tumori, spesso precocemente:

1) Alti livelli sierici di miR-21 sono associati con la diagnosi e la prognosi di pazienti con linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL), mentre nella leucemia mieloide

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

acuta (AML), una forma di neoplasia ematologica comune negli adulti, miR-150 e miR-342 sono iper-espressi e potrebbero essere dei buoni marcatori per questo tipo di tumore. Nella leucemia linfatica cronica (CLL) a cellule B i miR-195, miR-29a e miR-222 circolanti sono dei buoni indicatori per distinguere i pazienti con la patologia dai sani.

2) Il carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC), tumore polmonare tra i più comuni, potrebbe essere diagnosticato precocemente usando i miRNA, miR-25 e miR-223, che aumentano significativamente nel siero.

3) Diversi miRNA risultano alterati nel cancro coloretale (CRC): si è visto un significativo aumento di miR-29a e miR-92, mentre miR-601 e miR-760 sono notevolmente diminuiti nella fase iniziale. Per una diagnosi precoce si può usare una combinazione di sette miRNA esosomiali (let-7a, miR-23a, miR-21, miR-150, miR-223 e miR-1229), poiché questi miRNA sono molto aumentati rispetto agli individui sani. L'espressione di miR-200c aumenta notevolmente nel siero di pazienti con CRC e ciò è correlato con la metastatizzazione linfonodale.

4) Riguardo la diagnosi del cancro gastrico (GC), si ha un minor numero di biomarcatori disponibili. Questi potrebbero essere: miR-18a, che è aumentato nel plasma dei pazienti con GC, miR-16, miR-25, miR-92a, miR-451 e miR-486-5p. miR-122 è iporegolato e miR-192 è iper-regolato per cui potrebbero essere usati per la diagnosi precoce di metastasi a distanza.

5) Nel plasma di pazienti con cancro ovarico epiteliale (EOC), miR-205 è significativamente aumentato, mentre miR-let-7f risulta significativamente ridotto.

6) Altri miRNA possono essere usati per la diagnosi precoce di altri tipi di cancro: ad esempio, sono stati identificati alti livelli di miR-21 in pazienti con cancro esofageo; alti livelli di miR-210 in pazienti con convenzionale carcinoma a cellule renali (cRCC); bassi livelli di miR-218 nei pazienti in fase avanzata di cancro del collo dell'utero, di adenocarcinoma cervicale, e di metastasi linfatica.

7) Ancora, tre miRNA, let-7f, miR-151-5p e miR-222, sono significativamente iper-regolati nel siero di pazienti con carcinoma papillare della tiroide (PTC). Invece, un

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

gruppo di sette miRNA, miR-15b \*, miR-23a, miR-133a, miR-150 \*, miR-197, miR-497 e miR-548B-5p, è notevolmente ridotto in pazienti con tumore astrocitario.

8) Nella saliva di pazienti con carcinoma a cellule squamose orale, sono stati trovati bassi livelli di due miRNA, miR-125a e miR-200a. Inoltre due miRNA, miR-125b e miR-126, presenti nelle urine sono indicati come biomarcatori altamente sensibili (80%), specifici (100%), e non invasivi per la diagnosi e la prognosi del cancro della vescica (23).

9) Diversi studi hanno messo in evidenza che l'utilizzo dei miRNA extracellulari può permettere di distinguere il carcinoma epatocellulare (HCC) da altre malattie epatiche. In particolare nel siero di pazienti con HCC, miR-16 e miR-199a sono significativamente diminuiti rispetto ai livelli di pazienti con malattia epatica cronica. miR-15b, miR-130b e miR-16 sono potenziali marcatori diagnostici specifici che permettono di discriminare i pazienti con HCC da quelli affetti da epatite da HBV (23).

### **1.3. Maturazione dei miRNA e loro espressione**

Nella maggior parte degli organismi i miRNA sono in numero inferiore rispetto al numero degli mRNA e delle proteine. Questo perchè un unico miRNA può regolare centinaia di messaggeri e, viceversa, un singolo mRNA può essere regolato da diversi miRNA (24). Circa il 60% dei geni umani sono regolati da molteplici miRNA in modo cooperativo (14).

#### **1.3.1. Biogenesi dei miRNA**

I geni MIRNA, secondo l'organizzazione genomica, possono essere intergenici o intragenici. I geni MIRNA intergenici hanno unità trascrizionali (TU) indipendenti, in cui promotore, sequenza di trascrizione e regioni di terminazione non si sovrappongono con altri geni. I MIRNA intragenici sono localizzati entro sequenze di

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

trascrizione, all'interno di regioni introniche o esoniche, e sono definiti geni ospiti. Nel caso particolare dei mirtroni, l'introne del gene ospite è l'esatta sequenza del pre-miRNA, con siti di *splicing* su entrambi i lati; in tal caso, per la maturazione del mirtrone non è richiesto il processamento da parte di Drosha (25).

L'espressione dei miRNA è regolata da fattori di trascrizione ma anche da altri miRNA, in risposta a stimoli di diversa natura, esogeni ed endogeni. Non solo, proteine come HnRNPA1, SMAD1 e SMAD5 sono capaci di interagire con i precursori dei miRNA influenzandone il processo di maturazione (3).

Un meccanismo maturativo post-trascrizionale ampiamente diffuso è l'*RNA editing*. Il processo è catalizzato dalla famiglia degli enzimi Adenosina Deaminasi agenti sugli RNA (ADAR), capaci di regolare il processamento e il funzionamento dei miRNA (26). La conversione dei residui di adenosina in inosina nei trascritti pri-miRNA ad opera degli enzimi ADAR (3) altera la conformazione strutturale di questi precursori (26), destabilizzandone il doppio filamento (27), inibendone il processamento e indirizzando il miRNA modificato su nuovi mRNA bersaglio, sopprimendo così il complesso RISC (26).

Alcune proteine regolatrici, legandosi al miRNA maturo, ne inducono la degradazione. Solo un 10% dei miRNA sarebbe regolato dalla metilazione del rispettivo DNA (3): geni MIRNA localizzati nel genoma vicino alle isole CpG sono influenzati dall'ipermetilazione della cromatina situata nelle vicinanze (28). Un altro meccanismo che regola la trascrizione dei miRNA è la modificazione istonica (29).

Le molecole di miRNA sono generalmente sintetizzate come lunghi trascritti primari, detti pri-miRNA, soprattutto dalla RNA polimerasi II, alcuni dalla RNA pol III. La maggioranza dei miRNA deriva dagli esoni o dagli introni di RNA non codificanti e solo un terzo si trova negli introni di geni ospiti che codificano per mRNA (30).

Come gli mRNA, i pri-miRNA sono poliadenilati all'estremità 3' e legano una 7-metilguanosina all'estremità 5' (31).

Il pri-miRNA è clivato dall'enzima nucleare RNAsi III Drosha in un breve trascritto, con bp <100, noto come precursore di miRNA o pre-miRNA caratterizzato da una

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

struttura *stem-loop*. Drosha richiede per il processamento un coattivatore, DGCR8 (*DiGeorge critical region 8*) o Pasha. La proteina DGCR8 lega l'RNA a doppio filamento e stabilizza l'associazione di Drosha con il pri-miRNA. La proteina Drosha destabilizza l'mRNA di DGCR8 attraverso una struttura a forcina presente all'estremità 5'-UTR del mRNA, mentre DGCR8 stabilizza la proteina Drosha. Sebbene Drosha e DGCR8 rappresentino il core del microprocessore, questo complesso è caratterizzato da altre proteine, fondamentali per la struttura del complesso. Due di queste, le proteine elicasi DEAD-box o p68 (nota anche come DDX5) e la p72 (o DDX17) se delete portano alla morte dell'embrione (31).

Una volta prodotto il pre-miRNA (precursore miRNA), viene esportato fuori dal nucleo tramite exportina-5 in modo ran\_GTP dipendente. Il legame del pre-miRNA a exportina-5 è influenzato dalla lunghezza di 16-18 paia di basi e dalle alterazioni all'estremità 3' dello *stem* del miRNA. Una volta nel citoplasma, il pre-miRNA viene rilasciato da exportina-5 dopo l'idrolisi di GTP (32).

Nel citoplasma, il pre-miRNA è ulteriormente processato dall'enzima RNAsi III in miRNA maturo (~22nt). Il clivaggio della struttura ad anello e dell'estremità 3' avviene in modo ATP indipendente. Dopo la scissione, un solo filamento del miRNA duplex viene incorporato nel complesso RISC. La selezione di uno o dell'altro filamento avviene in base alle proprietà termodinamiche del duplex: il filamento meno stabile all'estremità 5' è quello che di solito viene selezionato. Il miRNA maturo legato a RISC successivamente si associa ad una proteina Argonata (la più comune è Ago2) e guida il complesso RISC verso siti parzialmente complementari dell'estremità 3'-UTR degli mRNA bersaglio (32).

La specificità di riconoscimento tra miRNA e mRNA avviene tramite il perfetto appaiamento tra la sequenza complementare corrispondente ai nucleotidi 2-8 dell'estremità 5' del miRNA, nota come "*seed sequence*", e l'mRNA bersaglio. Recenti studi hanno dimostrato che questo appaiamento non è strettamente necessario e identificano il legame e la repressione del mRNA tramite diversi duplex miRNA-mRNA senza *seed*, noti come "*seedless*" (32).

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

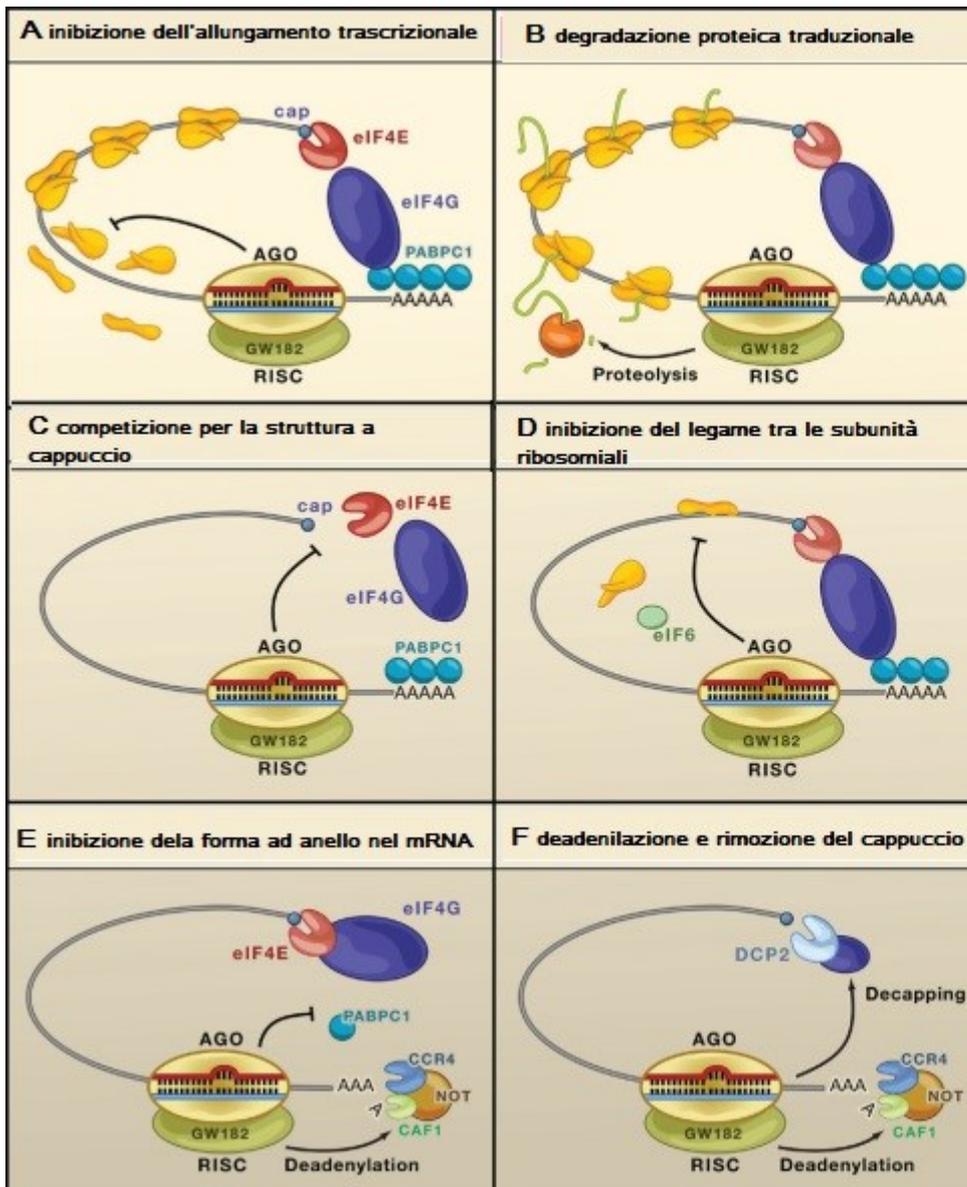
Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

Il silenziamento post-trascrizionale del mRNA bersaglio è dovuto ai componenti del complesso RISC attivato dall'appaiamento miRNA/mRNA. I componenti proteici chiave di questo complesso sono i membri della famiglia Argonauta (Ago) costituiti da un dominio PAZ (Piwi Argonaute Zwille), coinvolto nel legame con il miRNA, e un dominio PIWI, implicato nel taglio (33).

Negli esseri umani, Ago2 è la sola proteina Argonauta capace di scissione endonucleolitica (33).

I meccanismi attivati degradano e/o bloccano la traduzione delle molecole di mRNA bersaglio in base al tipo di proteina Ago e all'appaiamento che si presenta. I miRNA sono in grado di regolare l'espressione proteica tramite quattro distinti meccanismi: degradazione co-traduzionale delle proteine; repressione della traduzione durante la fase di allungamento; distacco prematuro dei ribosomi che determina la fine della trascrizione; inibizione dell'inizio della traduzione (34) (**Fig.1**).



**Fig.1** Meccanismo di silenziamento genico ad opera del miRNA [modificata da Eulalio A et al., 2007, (34)]

(A) meccanismo di post-inizio. Il microRNA (in rosso) inibisce la traduzione del mRNA bersaglio o bloccando “l’elongazione” della traduzione o promuovendo il distacco prematuro dei ribosomi (*ribosome drop-off*). (B) Degradazione co-traduzionale delle proteine. La traduzione non è inibita, ma la catena polipeptidica nascente viene degradata co-traduzionalmente. (C–E) Meccanismi di inizio. I microRNA intervengono nelle prime fasi del processo di traduzione, ancor prima della fase di elongazione. (C) Le proteine Argonata competono con eIF4E per legarsi alla struttura a cappuccio (cyan dot). (D) Le proteine Argonata reclutano il fattore di inizio eucariotico umano 6, eIF6, che impedisce l’inappropriato legame tra la subunità ribosomiale grande 60S e la subunità piccola 40S. (E)

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell’espressione genica nell’epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

Le proteine Argonata contrastano la formazione di un anello chiuso nel mRNA attraverso un meccanismo mal definito che include la deadenilazione. (F) Degradazione del mRNA mediata dai miRNA. Gli mRNA legati ai miRNA subiscono una deadenilazione seguita dalla rimozione del *cap* del mRNA bersaglio provocandone la degradazione. In figura sono mostrati i componenti principali del complesso deadenilasi (CAF1, CCR4, e il complesso NOT), l'enzima di *decapping* DCP2, e diversi attivatori del *decapping* (cerchi blu scuro) (Nota: la degradazione del mRNA potrebbe essere un meccanismo indipendente dal silenziamento o una conseguenza della repressione della traduzione, indipendentemente dal fatto che la repressione si verifica al livello di inizio o di post-inizio della traduzione). RISC è raffigurato da un complesso comprendente una proteina Argonata (in giallo) e GW182 (in verde). L'mRNA è rappresentato in una configurazione ad anello chiuso prodotto dalle interazioni tra proteina citoplasmatica che lega i poli A (PABPC1; legata alla coda di poli A all'estremità 3') ed eIF4G (legata alla proteina citoplasmatica che si lega al *cap* eIF4E).

I microRNA possono anche spegnere i loro bersagli sequestrando l'mRNA in piccoli complessi citoplasmatici separati, i corpi di "rielaborazione" del mRNA o i *P-bodies* (conosciuti anche come *GW-bodies* e *Dcp bodies*), che escludono il meccanismo della traduzione (34).

I *P-bodies* sono piccoli domini sferoidi proteici e dinamici, citoplasmatici, presenti dalle cellule di lievito a quelle umane (3). Nelle cellule ci sono strutture citoplasmatiche simili ai *P-bodies* come i granuli da stress, gli esosomi e i corpi multivescicolari che contengono alcuni degli stessi componenti proteici contenuti nei *P-bodies*.

I *P-bodies* sono influenzati da una varietà di fattori cellulari quali il livello di glucosio, la pressione osmotica e la proliferazione cellulare. Così allo stesso modo, i granuli da stress rispondono in numero e dimensioni a stimoli ambientali come la temperatura, l'infezione, l'ipossia e la luce ultravioletta. Le proteine effettrici del complesso RISC, Ago 1-4, si trovano nei *P-bodies* insieme ai filamenti duplex dei miRNA. I *P-bodies* sono essenziali per il funzionamento dei miRNA, infatti inibendo la formazione dei *P-bodies* mediante l'esaurimento della GW182 (*glycine-tryptophan repeat-containing protein* di 182 kDa che è il maggiore componente proteico dei *P-bodies*) verrebbe ostacolato in modo significativo la funzione dei miRNA (3). Viceversa, la rimozione del complesso microprocessore inibisce la formazione dei *P-bodies*. L'assemblamento e l'attivazione di RISC avvengono nei *P-bodies*. GW182 è

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

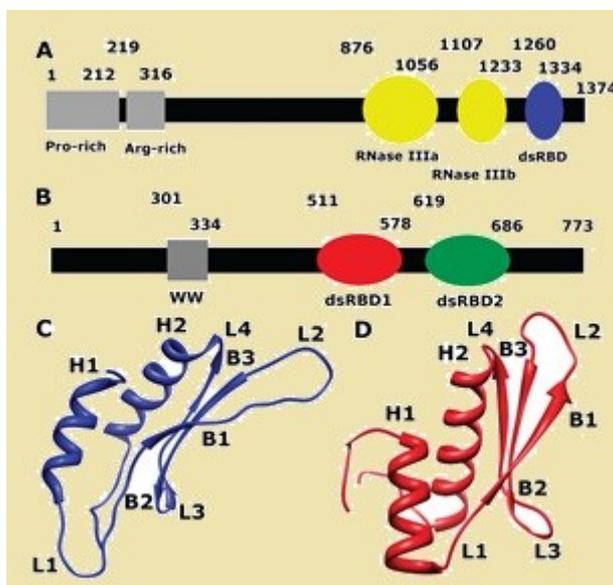
Università degli studi di Sassari

uno dei principali componenti di RISC ed è coinvolto funzionalmente nel silenziamento sia *slicer*-dipendente che *slicer*-indipendente (3).

### 1.3.2. Il microprocessore

La struttura secondaria tipica del pri-miRNA, solitamente, consiste di quattro parti: un anello terminale, uno stelo superiore comprendente il duplex del miRNA maturo formato da due anse elicoidali, uno stelo inferiore consistente in un'estensione dell'ansa elicoidale del miRNA duplex e i segmenti basali, sequenze fiancheggianti a singolo filamento (35).

Il pri-miRNA, in genere lungo diverse kilobasi con un *cap* in 5' e una coda di poli A in 3', trascritto dalla RNA polimerasi II, viene processato in precursore a forma di forcina (*hairpin*) da un membro della famiglia delle ribonucleasi III, Drosha (36).



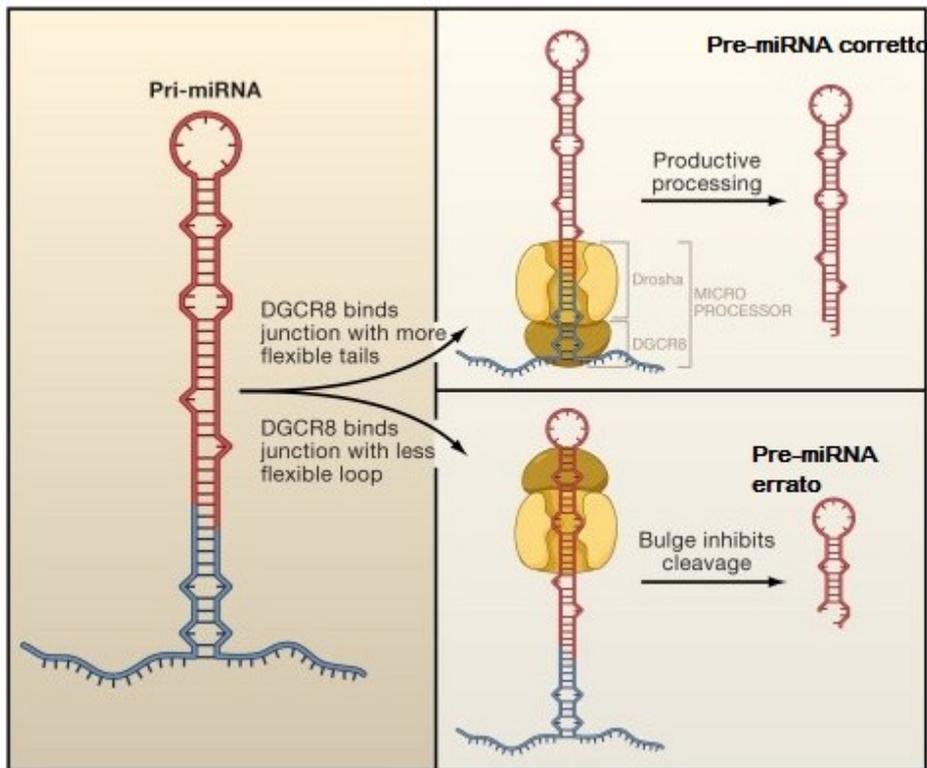
Nell'uomo Drosha, lungo 1374 residui amminoacidici nella sua isoforma primaria, presenta una regione ricca di prolina e una ricca di arginina/serina nella porzione N-terminale [regioni ricche di arginina sono responsabili del riconoscimento del ssRNA (37)] (Fig.2).

**Fig.2** Struttura di Drosha [modificata da Wostenberg C et al. 2010, (37)]

Drosha, insieme al suo cofattore DGCR8 (noto anche come *Pasha* in *D. melanogaster* e *C. elegans*) forma un complesso chiamato “microprocessore” (36).

Sono stati proposti due modelli di processamento ad opera di Drosha: a) secondo quello proposto da Zeng et al. (2005) il taglio da parte dell’enzima avverrebbe a circa 22 nt dalla giunzione dell’anello (*loop*) terminale del singolo filamento di RNA (ssRNA) e dello stelo superiore, e richiede le sequenze fiancheggianti a singolo filamento intorno alla struttura a forcina (*hairpin*) del miRNA; b) il secondo modello, proposto da Han et al. (2006), si basa sul riconoscimento da parte di DGCR8, componente principale del microprocessore, della giunzione tra lo stelo più basso e il singolo filamento di RNA (segmento basale), guidando in tal modo Drosha a tagliare ~11 nt dalla giunzione, anche se è noto che la regione terminale ad ansa (*loop*) è necessaria per il riconoscimento da parte del Microprocessore. Nonostante la regione ad ansa (*loop*) terminale sia importante per il riconoscimento e per l’elaborazione di alcuni pri-miRNA, è sempre meno importante della regione a stelo inferiore (35) per la funzione specifica del Microprocessore.

Il taglio ad opera di Drosha è un evento cruciale per la maturazione del miRNA (**Fig.3**). Se il taglio slitta di un singolo nucleotide lungo il miRNA, allora anche il taglio per effetto di Dicer verrà slittato e il miRNA finale prodotto avrà estremità 5’ e 3’ differenti. Se lo slittamento del singolo nucleotide inverte le relative stabilità dell’estremità 5’ del filamento miRNA e di quello miRNA\* (che in genere, è quello degradato), il filamento sbagliato può essere scelto come miRNA maturo. Anche se le stabilità relative sono conservate e il filamento corretto viene caricato in un complesso funzionale proteina-RNA, lo slittamento dell’estremità 5’ del miRNA riposizionerà la sequenza “*seed*”, ridefinendo l’insieme dei mRNA regolati (38).



**Fig.3** Processamento dei pri-miRNA mediante Drosha e DGCR8, componenti del Microprocessore [modificata da Seitz H et al., 2006, (38)]

Drosha necessita di DGCR8 per la rielaborazione dei pri-miRNA. DGCR8 è stata la prima proteina a essere identificata nell'uomo e il gene che lo codifica è localizzato nel cromosoma 22. Questo gene è implicato nella sindrome Di George, dove risulta deleto.

Mentre Drosha ha attività catalitica, DGCR8 ha il ruolo di riconoscere il pri-miRNA. DGCR8 contiene un dominio WW e due domini dsRNA-binding (dsRBD).

I domini dsRBD presentano una struttura  $\alpha\beta\beta\alpha$  che rappresenta la regione primaria che interagisce con i dsRNA.

Il core di DGCR8 può essere suddiviso in: DGCR8S (residui 493-720), DGCR8M (493-738), DGCR8L (484-750) e DGCR8 $\Delta$ N483 (484-773).

DGCR8S presenta una struttura altamente compatta in cui la sua elica C-terminale si trova tra i due dsRBD che sono connessi da una breve elica e da un *loop*. I due domini

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

dsRBD sono disposti in modo pseudosimmetrico. DGCR8S interagisce principalmente con il dsRNA del pri-miRNA. Il pri-miRNA probabilmente interagisce con DGCR8L in due orientamenti, senza preferenze. Drosha-DGCR8 riconosce la giunzione ssRNA-dsRNA e determina la direzione del legame miRNA. Il processamento genera pre-miRNA funzionali, mentre il mancato processamento genera miRNA non funzionali (39).

### 1.3.3. Exportina-5

Le cellule eucariotiche spesso richiedono trasportatori nucleocitoplasmatici. Il nucleo è privo del sistema necessario per la sintesi proteica, per cui importa le proteine di cui ha bisogno dal citoplasma. Viceversa, le subunità ribosomiali, i tRNA, gli mRNA e altre specie di RNA sono sintetizzate nel nucleo e vengono esportate nel citoplasma. Il passaggio nucleocitoplasmatico delle diverse molecole avviene attraverso dei complessi transmembrana, noti come pori nucleari, che permettono il passaggio tramite diffusione passiva o trasporto attivo.

La diffusione passiva è veloce e riguarda molecole di piccole dimensioni (40). Il trasporto attivo permette il passaggio di molecole piuttosto grandi con un peso molecolare fino a diversi milioni di Dalton. Il trasporto attivo è tipicamente dovuto a recettori che utilizzano un *input* di energia metabolica (trasporto attivo), permettendo il passaggio anche di molecole cariche (41).

La maggior parte delle vie di trasporto proteico nucleocitoplasmatico sono mediate da importine o exportine. Sono recettori che possiedono un sito di legame Ran-GTP, attraversano il nucleo e il citoplasma, e trasferiscono molecole cariche da un lato all'altro della membrana, utilizzando come fonte di energia il gradiente Ran-GTP. Nel nucleo le exportine legano molecole cariche, in presenza di alti livelli Ran-GTP, e le traslocano, come complessi trimerici Ran-GTP-exportina-molecola carica, nel citoplasma, dove Ran e le molecole cariche vengono rilasciate in seguito all'idrolisi di GTP. L'exportina può ritornare nel compartimento nucleare e mediare così un nuovo trasporto (40).

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

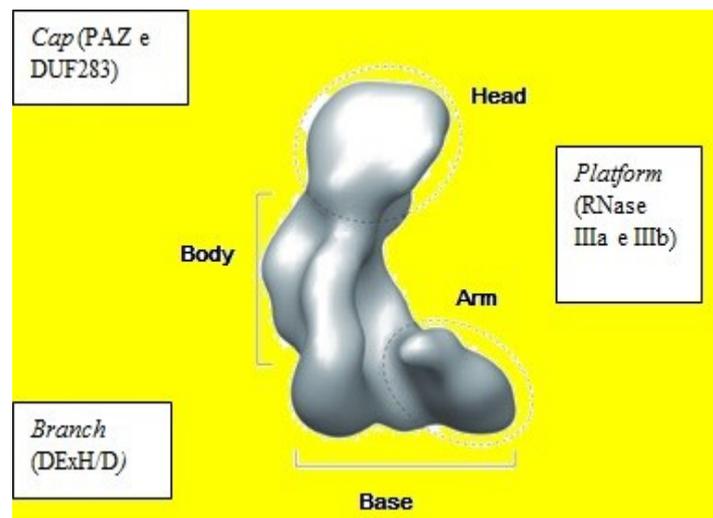
Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

L'exportina-5 è coinvolta nel trasporto dal nucleo di diverse specie di RNA privi di *cap*, come i pre-miRNA, i tRNA, estesi rRNA e VA1 RNA adenovirus. Questo trasportatore riconosce direttamente la struttura del dsRNA con la sporgenza in 3' in modo Ran-GTP dipendente. Tridimensionalmente il complesso Exportina-5, pre-miRNA e Ran-GTP ricorda un guanto da baseball. Nella parte inferiore del guanto, una struttura simile a un tunnel riconosce l'estremità 3'-terminale sporgente dall'RNA (42).

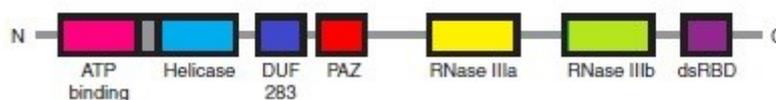
#### 1.3.4. Dicer

Il gene *Dicer1* si trova sul cromosoma 14q32.13, contiene 1.922 aminoacidi e comprende 27 esoni. Codifica un enzima costituito da più domini con struttura terziaria organizzata come un "origami" di domini che interagiscono funzionalmente (la sua forma ricorda una "L") (43) (Fig.4).



**Fig.4** Organizzazione spaziale di Dicer1 [modificata da Foulkes WD et al. 2014 (43)]

In tutti gli eucarioti, Dicer conserva il dominio RNAsi, il dominio PAZ (piwi argonaute zwiille) e il dominio dsRBD mentre presenta una diversa composizione all'estremità N-terminale (27). Dicer umana (hDicer, 220 kDa) contiene un dominio DExH/D N-terminale (ATPasi-elicasi), un dominio DUF283, un dominio PAZ, due domini RNAsi III e un dominio che lega l'RNA a doppio filamento (dsRBD) (27) (**Fig. 5**).



**Fig.5** Organizzazione del dominio di Dicer [modificata da Taylor DW et al., 2013 (44)]

La struttura secondaria tipica di un pre-miRNA contiene un *loop* terminale e una struttura a stelo con il 5' fosfato e due nucleotidi all'estremità 3' (27).

Nel processo di maturazione del pre-miRNA, il dominio PAZ di Dicer, localizzato nella testa della "L" (**Fig. 5, 6**), riconosce e lega l'estremità 5' fosfato e i 2-nucleotidi (nt) dell'estremità 3' di un pre-miRNA (27).

Nella metà inferiore, o "corpo" della L, si trovano i domini RNasi IIIa e IIIb (**Fig.5, 6**), che formano un dimero intramolecolare costituendo così il "core" catalitico (43) che funziona come un centro di rielaborazione endonucleasico per il dsRNA (27). Ciascun dominio probabilmente è responsabile della scissione di un filamento del dsRNA. Per il suo funzionamento, Dicer1 richiede ioni magnesio, posizionati all'interfaccia tra i domini RNasi III e il dsRNA (43).

Alla base della L (detto anche "*branch*") (Fig.5, 6), in prossimità dei domini carbossi-terminale dell'RNasi III si trova il dominio box elicasi DExH/D (43). Il dominio DExH/D N-terminale (ATPasi-elicasi) interagisce col *loop* terminale del pre-miRNA in modo tale da allineare il pre-miRNA al sito RNasi III per il clivaggio. La sequenza

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

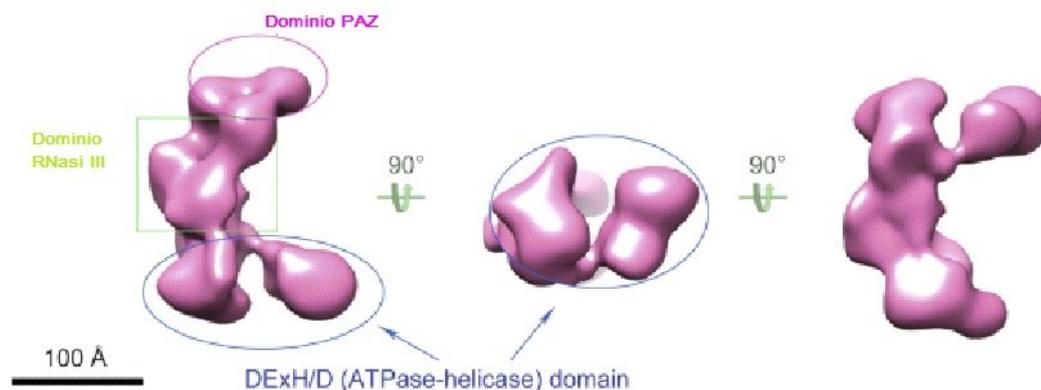
Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

terminale del *loop* del pre-miRNA potrebbe avere un impatto diretto sull'affinità di legame del RNA alla proteina Dicer e anche sul clivaggio di Dicer. Inoltre, il *loop* terminale gioca anche un ruolo critico sulla precisione del processamento di Dicer (27).

Inizialmente si pensava che il dominio elicastico incidesse negativamente sull'attività di scissione di Dicer, e gli era stato attribuito il ruolo di repressore intramolecolare. Curiosamente, e al contrario, questo dominio è necessario per la biogenesi o l'accumulo di una specifica classe di endo-siRNA in *Caenorhabditis elegans*. Recenti studi sulla struttura indicano che il dominio elicastico interagisce in maniera diversa coi substrati che mostrano struttura terminale differente, come ad esempio l'anello presente nella forcina del pre-miRNA rispetto all'appaiamento perfetto tra le basi del dsRNA (43).

Le proteine regolatrici di hDicer sono: TRBP (*transactivation response RNA binding protein*) nota anche come TARBP2 fosforilata dalla protein chinasi del reticolo endoplasmatico p-ERK (45); PACT (proteina attivatore di PKR, nota anche come PRKRA, paralogo di TRBP) e ADAR1 (*adenosine deamidase acting on RNA*). Esse interagiscono con hDicer tramite il suo dominio DExH/D N-terminale (ATPasi-elicasi) (27). Il meccanismo di regolazione dell'attivazione di Dicer attraverso il dominio DExH/D N-terminale (ATPasi-elicasi) non è ancora ben chiaro. Sono state attribuite diverse funzioni alle interazioni con le due proteine TRBP e PACT, compreso il riconoscimento selettivo dei substrati strutturalmente differenti (come il pre-siRNA, il dsRNA derivato dal pre-miRNA, o il più lungo dsRNA) ad opera di Dicer, il rilevamento e lo smistamento differenziato dei loro filamenti maturi in RISC come parte del RLC (43).



**Fig. 6** Struttura di Dicer [modificata da Liu Z et al., 2015 (27)]

### 1.3.5. Argonauta 2

Argonauta 2 (AGO 2), conosciuta anche come EIF2C2, appartiene alla famiglia delle proteine Argonauta ed è altamente conservata nelle varie specie. Delle proteine della famiglia delle AGO, AGO2 è l'unico membro con attività catalitica e ha un ruolo essenziale nel complesso RISC. La struttura cristallina di AGO 2 umana è costituita da un dominio N, che avvia lo svolgimento del RNA duplex durante l'assemblamento di RISC, il dominio PAZ che contiene una variante OB fold e si lega all'estremità 3' dei piccoli RNA, il dominio MID che riconosce i nucleotidi in 5' del RNA guida attraverso una piega simile a quella di Rossmann e il dominio PIWI che conferisce attività catalitica ad AGO2. Il cuore di AGO2 è costituito da quattro domini:

- il dominio N, indispensabile per lo svolgimento del RNA avvolto all'interno di AGO2 durante la formazione del complesso RISC ;
- il dominio PAZ, che si trova sia in AGO2 che in Dicer ed è altamente conservato nelle specie. È caratterizzato da una struttura OB-fold che si lega al singolo filamento nucleotidico ancorandosi ai due nucleotidi dell'estremità 3';
- il dominio MID, localizzato tra i domini PAZ e PIWI, ha una struttura simile alla piega di Rossmann e funge da tasca che lega l'estremità 5' del RNA

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

guida. Inoltre vicino a MID è presente un sito che funziona con esso sinergicamente. Questi siti presentano due ioni solfato e hanno Lys599 e Lys638 altamente conservate, questo rende il dominio MID affine al cap m7GpppG sul mRNA bersaglio ;

- il dominio PIWI, che esercita tre grandi funzioni all'interno di AGO2: fornisce attività endonucleasica come RNasi H, contiene il sito che lega il triptofano che è necessario per GW182 e altri fattori ricchi di triptofano, regolando l'interazione tra il dominio MID e DNA/RNA dovuto alla polarità e idrofilia sulla superficie dei domini MID/PIWI (46) (Fig.7).



Fig. 7 Struttura lineare di Ago2 [modificata da ZhenLong Ye et al., 2015 (46)]

#### 1.4. miRNA e patologie

I miRNA sono coinvolti nella maggior parte di processi biologici e in diverse patologie, come ad esempio nel cancro, nella nefropatia diabetica (DN) e nell'Alzheimer (AD). Ad esempio nella nefropatia diabetica, una delle principali patologie che porta complicazioni microvascolari, causa di danno renale, sono coinvolti miRNA quali miR-29, miR-192 e miR-200a/b/c.

I livelli di miR-29 sono ridotti nella DN e questo causa la perdita diretta dell'inibizione dell'espressione del collagene, mentre i livelli degli altri due miRNA, miR-192 e miR-200 b/c, sono aumentati. Il loro incremento porta a un aumento dell'inibizione dei repressori trascrizionali quali Zinc finger E-box binding homeobox 1 e 2 (ZEB1/2). Questi repressori servono a inibire la produzione di collagene nelle cellule mesangiali del rene, facilitando in questo modo la produzione della matrice. L'inibizione di miR-192 aumenta *in vivo* l'espressione di ZEB1/2, che riducono

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

l'espressione dei marcatori di fibrosi (TGF- $\beta$ , collagene, fibronectina) e diminuiscono l'ispessimento della membrana basale glomerulare. I cambiamenti fibrotici che avvengono nel glomerulo nella DN sono dovuti ai miRNA miR-29, miR-192 e miR-200 a/b/c (47).

I miRNA sono espressi anche nel sistema nervoso centrale, dove regolano la differenziazione neuronale e la plasticità delle sinapsi. Tra i miRNA coinvolti nell'Alzheimer ricordiamo:

miR-9 che è altamente espresso nell'ippocampo del feto, mentre è ridotto nell'Alzheimer. Il bersaglio di questo miRNA è il recettore per il fattore di crescita dei fibroblasti (FGFR1), NF $\kappa$ B e sirtuina1 (SIRT1), una deacetilasi. Inoltre miR-9 ha come bersaglio il fattore di trascrizione REST che è coinvolto nello spegnere l'espressione del gene neuronale nelle cellule non neuronali.

miR-107 risulta ridotto nella corteccia temporale nel primo stadio dell'AD. Questo miRNA può anche modulare la chinasi 5 dipendente da ciclina (CDK5) che nell'AD risulta sregolata, e la metalloproteinasi ADAM10.

miR-29 incrementa *in vitro* la produzione di amiloide. miR-29 è implicato nell'invecchiamento cerebrale, come nella modulazione dell'attività dei microglia. Tra i bersagli di miR-29 ci sono i modulatori dei microglia come il fattore di crescita dell'insulina (IGF-1) e il ligando frattalchina (CX3CL1).

miR-34 nell'AD regola l'espressione di p53, che è associata alla fosforilazione di tau. Alti livelli di questo miRNA sono presenti nell'ippocampo di pazienti con AD.

miR-181 è coinvolto in diversi processi patofisiologici e regola geni come l'oncogene RAS e il fattore di necrosi tumorale alfa (48).

### 1.4.2 miRNA nelle patologie epatiche

I miRNA regolano numerosi e fondamentali processi biologici in tutti i tipi di cellule, tra cui quelle del fegato, e influenzano complessi programmi di espressione genica in quasi tutti i processi cellulari (49).

Il fegato è uno degli organi più importanti del nostro organismo e date le sue innumerevoli funzioni può essere considerato un vero e proprio laboratorio chimico.

Alterazioni dei miRNA intracellulari sono correlate con varie malattie del fegato, tra cui epatite virale, steatoepatite alcolica e non alcolica, danno epatico indotto da farmaci, malattie autoimmuni del fegato e lesioni da ischemia-riperfusion.

L'accumulo eccessivo di trigliceridi e acidi grassi epatici è una caratteristica di diverse malattie del fegato tra cui la malattia epatica alcolica (ALD), NAFLD e NASH.

I miRNA hanno un ruolo cruciale nell'omeostasi alcolica. Nel fegato, miR-122 regola l'espressione di vari geni coinvolti nel metabolismo dei lipidi e del colesterolo epatico, esercitando un ruolo centrale nel mantenimento dell'omeostasi del fegato. L'inibizione di miR-122 mediante un antisense ha ridotto i livelli di colesterolo plasmatico sia nel topo che nello scimpanzè. Una riduzione nell'espressione epatica di miR-122 si ha in NASH nell'uomo e nei modelli animali. La delezione del gene che codifica questo miRNA porta, nei topi, allo sviluppo di steatoepatite, fibrosi e HCC. Malgrado il fatto che nel siero di topi deficienti di miR-122 si presentino livelli più bassi di colesterolo, LDL e trigliceridi rispetto ai topi *wild-type*, essi sviluppano steatoepatiti e HCC. Anche miR-33, miR-34, miR-103, miR-104 e miR-370 modulano i geni regolatori del colesterolo e dei lipidi. miR-370 influisce sul metabolismo lipidico agendo sull'enzima mitocondriale, sulla transferasi palmitolocarnitina, che è coinvolta nel trasporto di acidi grassi a catena lunga attraverso la membrana. miR-34a bersaglia la sirtuina 1 (49), SIRT1, epatica (è una proteina che deacetila le proteine che contribuiscono alla regolazione delle funzioni metaboliche come lipogenesi, gluconeogenesi, sintesi proteica, omeostasi dell'acido biliare) (50) ed è stata trovata un incremento nei livelli di questo miRNA con una diminuzione concomitante dei livelli di SIRT1 nei fegati grassi di ratti obesi indotti

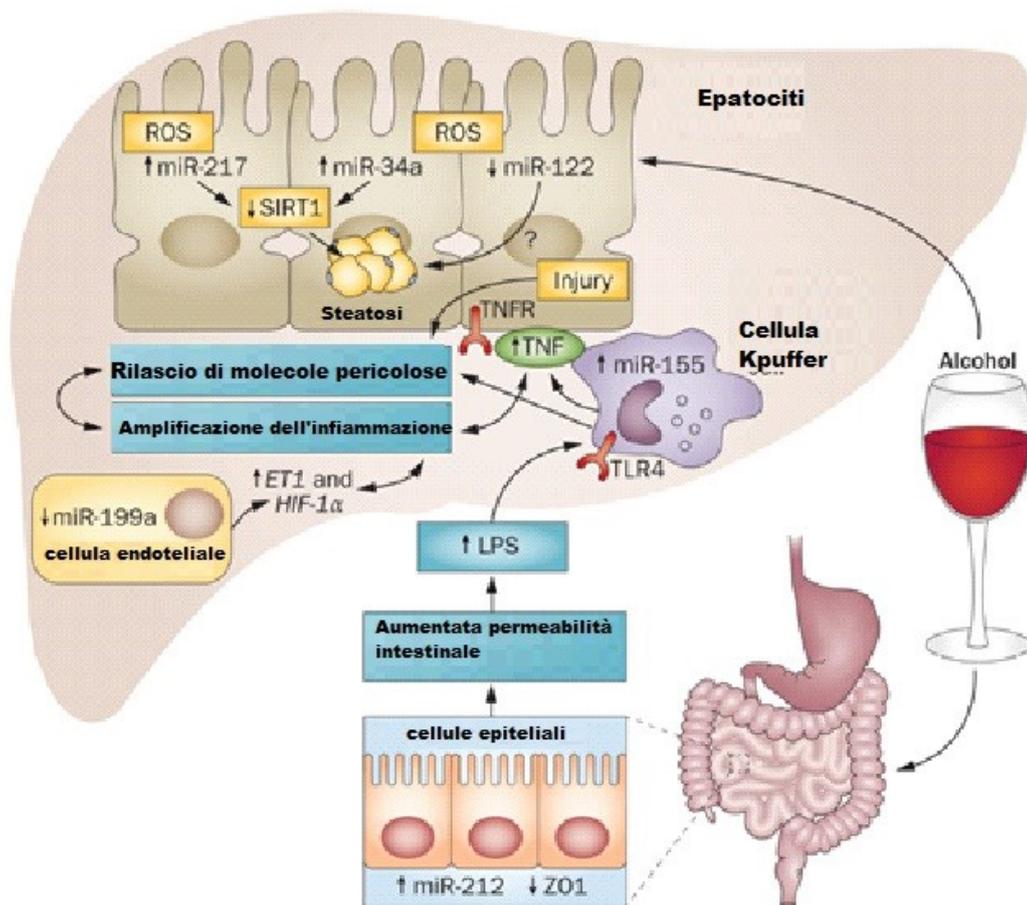
Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

con la dieta. In ALD si ha un'induzione di miR-34a negli esseri umani. miR-34a regola i livelli di SIRT1 e caspasi-2 e contribuisce, in questa patologia, alla steatosi epatica. miR-27b è un centro regolatorio nel metabolismo lipidico, influenzando potenzialmente il cuore e il fegato. La disregolazione dei miRNA contribuisce alle anomalie metaboliche (49) (Fig.8).



**Fig. 8** Ruolo dei miRNA nelle patologie epatiche alcoliche [modificata da Gyongyi Szabo and Shashi Bala (49)]

I miRNA hanno un ruolo regolatorio nell'infiammazione epatica bersagliando varie molecole. Diversi miRNA sono implicati nella risposta infiammatoria: miR-155, miR-132, miR-125b, miR-146a, miR-150, miR-181, let-7 e miR-21. miR-155 è coinvolto

Dott.ssa Elisa Barattini

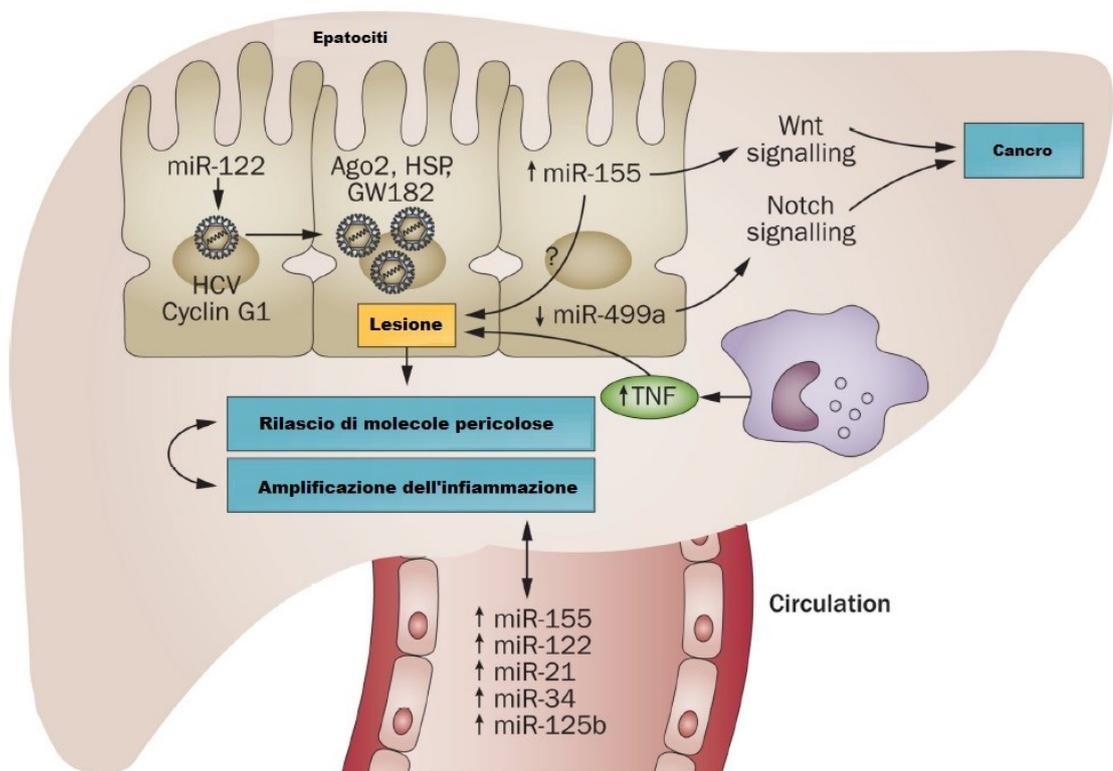
Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

nella risposta immunitaria adattativa e innata. I livelli di miR-155 incrementano nelle cellule Kupffer dopo che sono state alimentate con alcol. TNF è un bersaglio di miR-155 e promuove l'infiammazione. miR-155 è associato al carcinoma epatocellulare, HCC, nel quale regola i livelli di C/EBP. In pazienti affetti da HCV cronica è stato trovato un aumento di espressione di miR-155 nei monociti periferici, mentre in pazienti che hanno risposto al trattamento non si è avuto alcun aumento.

Nei pazienti con HCV c'è un'induzione del gene BIC (che codifica un precursore del miR-155 maturo) e di miR-155 maturo nelle cellule mononucleari del sangue periferico (PBMCs) di pazienti affetti da HCV. I livelli epatici di miR-155 sono aumentati in pazienti con HCV e promuovono l'HCC attraverso la via di segnale Wnt (Fig.9).



**Fig.9** miRNA nell'infezione cronica da HCV [modificata da Gyongyi Szabo and Shashi Bala (49)]

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

A differenza di miR-155, miR-146a è un regolatore negativo della via segnale TLR; esso spegne la risposta proinfiammatoria attraverso la via TRAF6 e IRAK-1. Coerentemente col suo ruolo di regolatore negativo nell'infiammazione, la deficienza di miR-146a nel topo acquisisce il fenotipo mieloproliferativo causando l'iperattivazione di NH-kB. mir-132 ha un ruolo centrale nell'infiammazione periferica.

I miRNA sono anche coinvolti nella regolazione della fibrosi epatica a molteplici livelli. Le citochine chiave e i fattori di crescita che determinano la fibrosi epatica regolano l'espressione di miRNA profibrogenici e antifibrogenici. TGF- $\beta$ , un modulatore della fibrosi, induce miR-21 nei pazienti con HCV, che a sua volta iporegola SMAD7, un regolatore negativo della via TGF- $\beta$ , determinando una regolazione a feedback positivo. I livelli di miR-199a, miR-199a\*, miR-200a e miR-200b sono strettamente associati con la progressione della fibrosi epatica sia in pazienti con HCV cronica che nei topi con fibrosi indotta da CCl4. Le famiglie di miR-199 e miR-200 promuovono la fibrosi epatica aumentando l'espressione di geni come quelli che codificano per procollagene  $\alpha$ 1, collagenasi3 e inibitori delle metalloproteinasi 1. miR-122 è richiesto per l'omeostasi del fegato e ridotti livelli di questo miRNA hanno effetti deleteri sul fegato. La deficienza di miR-122 nel topo porta allo sviluppo di steatoepatite e fibrosi. La somministrazione cronica di alcol modula l'espressione di miR-122, infatti in topi ai quali è stato somministrato alcol si sono trovati bassi livelli di questo miR nel fegato. Dato che l'uso cronico prolungato di alcol porta alla fibrosi epatica, un decremento nel miR-122 dopo il consumo di alcol suggerisce un diretto o indiretto ruolo di miR-122 nella fibrosi indotta da alcol. miR-217 è coinvolto nella steatosi indotta da alcol regolando SIRT1, che colpisce i fattori trascrizionali essenziali regolatori metabolici. L'alcol modula i miRNA in differenti tipi cellulari del fegato e ciò amplifica il suo effetto patogeno. I pazienti con NASH mostrano un'espressione epatica di miRNA alterata. I livelli di miR-122 nel

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

fegato sono sostanzialmente diminuiti nei pazienti con NASH ed è stato proposto che i livelli di miR-122 contribuiscano ad alterare il metabolismo lipidico epatico (49).

## 1.5. miRNA e HCC

I processi chiave nella biologia del tumore, quali il ciclo e la proliferazione cellulare, sono regolati dai miRNA a molteplici livelli, dunque l'alterazione dell'espressione dei miRNA contribuisce allo sviluppo del carcinoma epatocellulare, HCC (49).

Il carcinoma epatocellulare (HCC), una forma di cancro primario del fegato che colpisce maggiormente il sesso maschile (51), ha un'eziologia multifattoriale, poiché diversi fattori contribuiscono all'insorgere di questa patologia, come il virus dell'HBV e dell'HCV (23), l'abuso di alcol, il diabete e l'obesità associate al NASH (52), l'esposizione all'aflatossina B1 [una micotossina prodotta da *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, presente negli alimenti come mais, riso, olio di semi, frutta secca e noccioline, che sono stati conservati in condizioni di umido, caldo e insalubri, come quelle presenti nel Sud-est dell'Asia e nel Sud-Sahara dell'Africa (53)]. Anche le sindromi da accumulo di ferro (come malattie metaboliche ereditarie, ad esempio l'emocromatosi, la  $\beta$  talassemia o il sovraccumulo di ferro), l'abuso di alcol, il consumo di tabacco, la somministrazione di contraccettivi orali e l'assunzione della noce di Betel incrementano di 10 volte il rischio di sviluppare HCC (54).

Il carcinoma epatocellulare è la quinta causa di tumore negli uomini e la settima nelle donne (55). È più comune nei maschi che non nelle femmine (51), in quanto gli ormoni androgeni incrementano la trascrizione dei geni dell'HBV (infatti gli androgeni si legano direttamente ai siti del genoma virale e, viceversa, la proteina HBx dell'HBV può incrementare la trascrizione dei recettori androgeni). Invece gli ormoni estrogeni proteggono dal progredire dell'infezione da HBV (56). La maggioranza dei casi di HCC (84%) si riscontra nei Paesi in via di sviluppo, in particolare, dove l'infezione da HBV è endemica. Grazie alle campagne di vaccinazioni contro l'epatite B, l'incidenza dell'HCC in queste aree è calato, ma sta

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

aumentando nei Paesi Occidentali a causa dell'HCV e della steatosi non alcolica (NASH) (52).

### **1.5.2. Fattori di rischio dell'HCC**

L'HCC ha un'eziologia multifattoriale, sono diverse le cause che contribuiscono all'insorgere di questa patologia. Uno dei principali fattori di rischio è l'HBV, particolarmente diffuso nel Sud-est dell'Asia e nel sub-Sahara dell'Africa (52). Mentre nei Paesi Occidentali e nel Giappone, i fattori di rischio più comuni sono le infezioni da HCV, l'abuso di alcol, il diabete e l'obesità associate al NASH (52). Ulteriori fattori di rischio sono l'esposizione all'aflatossina B1 [che ha un forte potere mutageno, infatti induce la transversione da G a T all'interno del codone 249 del gene oncosoppressore p53 (57)], le sindromi da sovraccumulo di ferro [l'eccesso di ferro totale nel corpo dovuto a malattie metaboliche ereditarie, come l'emocromatosi, la  $\beta$  talassemia o il sovraccumulo di ferro, incrementa di 10 volte il rischio di sviluppare HCC (54)], l'abuso di alcol, il consumo di tabacco, la somministrazione di contraccettivi orali e l'assunzione della noce di Betel (54).

Da alcuni studi risulta che il consumo di caffè può ridurre il rischio di cancro epatico, dunque questa bevanda avrebbe un effetto protettivo, dovuto al suo contenuto di antiossidanti come gli acidi clorogenici (58).

L'HCC, come quasi tutti i tumori, viene classificato in base al sistema TNM che valuta le caratteristiche tumorali primarie (T), la presenza o l'assenza di linfonodi (N) e il livello di metastasi (M). Altre informazioni che possono essere riportate per caratterizzare l'HCC sono il grado istologico (G) e il livello di fibrosi (F) (59) (**Tabella 3**).

**Tabella** American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM Staging for Liver Tumors (7<sup>th</sup> ed., 2010) (1)

| <b>Tumore primario (T)</b>                                                                                                                   |                                                                                                                      |       |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|----|
| TX                                                                                                                                           | Primary tumor cannot be assessed                                                                                     |       |    |
| T0                                                                                                                                           | No evidence of primary tumor                                                                                         |       |    |
| T1                                                                                                                                           | Solitary tumor without vascular invasion                                                                             |       |    |
| T2                                                                                                                                           | Solitary tumor with vascular invasion or multiple tumors none more than 5 cm                                         |       |    |
| T3a                                                                                                                                          | Multiple tumors more than 5 cm                                                                                       |       |    |
| T3b                                                                                                                                          | Single tumor or multiple tumors of any size involving a major branch of the portal vein or hepatic vein              |       |    |
| T4                                                                                                                                           | Tumors with direct invasion of adjacent organs other than the gallbladder or with perforation of visceral peritoneum |       |    |
| <b>Linfonodi vicini al tumore</b>                                                                                                            |                                                                                                                      |       |    |
| NX                                                                                                                                           | Regional lymph nodes cannot be assessed                                                                              |       |    |
| N0                                                                                                                                           | No regional node metastasis                                                                                          |       |    |
| N1                                                                                                                                           | Regional lymph node metastasis                                                                                       |       |    |
| <b>Metastasi a distanza</b>                                                                                                                  |                                                                                                                      |       |    |
| M0                                                                                                                                           | No distant metastasis                                                                                                |       |    |
| M1                                                                                                                                           | Distant metastasis                                                                                                   |       |    |
| <b>Stadio anatomico</b>                                                                                                                      |                                                                                                                      |       |    |
| Stage I                                                                                                                                      | T1                                                                                                                   | N0    | M0 |
| Stage II                                                                                                                                     | T2                                                                                                                   | N0    | M0 |
| Stage IIIA                                                                                                                                   | T3a                                                                                                                  | N0    | M0 |
| Stage IIIB                                                                                                                                   | T3b                                                                                                                  | N0    | M0 |
| Stage IIIC                                                                                                                                   | T4                                                                                                                   | N0    | M0 |
| Stage IVA                                                                                                                                    | Any T                                                                                                                | N1    | M0 |
| Stage IVB                                                                                                                                    | Any T                                                                                                                | Any N | M1 |
| <b>Grado istologico</b>                                                                                                                      |                                                                                                                      |       |    |
| G1                                                                                                                                           | Well differentiated                                                                                                  |       |    |
| G2                                                                                                                                           | Moderately differentiated                                                                                            |       |    |
| G3                                                                                                                                           | Poorly differentiated                                                                                                |       |    |
| G4                                                                                                                                           | Undifferentiated                                                                                                     |       |    |
| <b>Fibrosi</b>                                                                                                                               |                                                                                                                      |       |    |
| The fibrosis score as defined by Ishak recommended because of its prognostic value in overall survival. This scoring system uses a 0-6 scale |                                                                                                                      |       |    |
| F0                                                                                                                                           | Fibrosis score 0-4 (none to moderate fibrosis)                                                                       |       |    |
| F1                                                                                                                                           | Fibrosis score 5-6 (severe fibrosis or cirrhosis)                                                                    |       |    |

**Tab.3** Classificazione dell'HCC in base al sistema TNM [modificata da Somasundaram Subramaniam et al., 2013 (59)]

Poiché al momento l'HCC può essere diagnosticato solo in fase tardiva tramite biomarcatori sierici, come  $\alpha$ -fetoproteina (AFP), des-gamma-carbossi-protrombina (DCP) e complessi antigene-immunoglobulina M del carcinoma squamocellulare (SCCA-IgM Cs), è necessario sviluppare strategie diagnostiche e preventive relative

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

all'HCC. Più tardi sarà effettuata la diagnosi, minore sarà il tempo di sopravvivenza dello stesso paziente (60).

### 1.5.3. miRNA nell'HCC

I microRNA (miRNA), molecole di RNA non codificanti, endogene, conservate nel corso dell'evoluzione, potrebbero essere usati come biomarcatori per facilitare l'identificazione, la caratterizzazione e la comprensione dei meccanismi della carcinogenesi indotta chimicamente (60).

La maggioranza dei miRNA localizzati nei siti fragili del DNA, sono coinvolti nel cancro. In linea con questa affermazione, miR-151 è frequentemente localizzato in una regione amplificata del cromosoma 8q24.3 associata con la metastasi intraepatica dell'HCC. Vari studi hanno suggerito il coinvolgimento di miR-221 nell'HCC. miR-221 è iper-regolato nell'HCC e controlla vari geni coinvolti nel ciclo cellulare e nel danno del DNA. miR-29 è iporegolato nell'HCC e bersaglia vari geni anti-apoptotici, come BCL2, MCL1 e MMP2. I miRNA non solo regolano i geni coinvolti nell'angiogenesi tumorale, nell'invasione e nella metastasi, ma modulano anche l'espressione di altri miRNA non codificanti, amplificando quindi il loro effetto (49). A questo proposito, miR-29 regola il lungo RNA non codificante, *maternally expressed gene-3* (MEG3), modulando la sua metilazione attraverso gli effetti su DNMT1 e DNMT3B (61).

Il miRNA, let-7g, appartiene alla grande famiglia di let-7. È significativamente iporegolato nell'HCC umano ed è strettamente associato alla metastasi. *In vitro*, il ripristino di let-7g inibisce marcatamente la proliferazione e la migrazione tumorale, reprime la transizione epitelio-mesenchimale (EMT) e induce l'apoptosi cellulare e l'arresto del ciclo cellulare bloccando la via di segnale K-Ras/HMGA2/Snail. Let-7g inoltre ha come bersagli Bcl-xL e il collagene di tipo 1  $\alpha 2$ , promuovendo così l'apoptosi e inibendo la migrazione delle cellule HCC (29). Lo stesso miR-199a reprime la proliferazione tumorale e induce l'apoptosi e l'arresto del ciclo cellulare regolando l'espressione della matrice metalloproteinasi-9 (MMP-9), del recettore

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

*frizzled* tipo 7 (FZD7) e il fattore che induce l'ipossia-1 $\alpha$  (29). miR-21 è il più comune miRNA sregolato nei tumori umani ed è coinvolto nella regolazione della proliferazione, differenziazione, apoptosi, angiogenesi, migrazione e invasione cellulare. miR-21 funziona come miRNA pro-metastatico nell'HCC e può promuovere l'invasione e la metastasi dell'HCC bersagliando l'omologo deuto della fosfatasi e della tensina (PTEN), l'endosulfatasi che degrada l'eparina (hSulf-1), e attivando la via di segnale AKT/ERK. Il gene HEPN1 è un altro bersaglio di miR-21 e il suo silenziamento indotto da questo miR accelera significativamente la crescita tumorale dell'HCC (29). miR-375 è un miRNA iporegolato nel cancro del fegato e ha come bersaglio direttamente l'effettore della via Hippo, yes-associated protein (YAP), un potente oncogene, che controlla la proliferazione e l'invasione del fegato. L'iper-espressione di questo miRNA nel fegato decrementa la proliferazione cellulare epatica, la clonogenicità, la migrazione/invasione e inoltre induce anche l'arresto in G1 e l'apoptosi. Inoltre questo miRNA, bersagliando *astrocyte elevated gene-1* (AE-1), è capace di reprimere la crescita delle cellule tumorali del fegato sia *in vitro* che *in vivo* (22).

miR-26a si riduce nell'HCC e questo miRNA promuove la proliferazione degli epatociti attraverso l'espressione proteina ciclo cellulare regolando G1/S- specific cyclin-D2 (CCND2) e G1/S-specific cyclin-E2 (CCNE2). miR-26a può indurre l'arresto in G1 nelle cellule tumorali epatiche umane. L'espressione di questo miRNA nei fegati non tumorali è più alta nelle donne che non negli uomini. L'espressione alterata dei miRNA è caratteristica anche dei pazienti con cirrosi biliare primitiva (PBC). miRNA come miR-122a, miR-26a, miR-328 e miR-299-5p sono coinvolti in processi quali la proliferazione, l'apoptosi, l'infiammazione, lo stress ossidativo e il metabolismo cellulare. miR-122, come miR-16a, è iporegolato, mentre gli ultimi due sono incrementati (49).

Il ripristino di miR-122 inibisce la proliferazione e la migrazione e incrementa l'apoptosi bersagliando AKT3 nelle linee cellulari HCC. miR-122 è capace di legarsi direttamente alla 3'UTR del gene *Distal-less4*, *DLX4*, e ne iporegola la sua

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

espressione, che reprime significativamente la proliferazione delle cellule HCC. miR-122 è associato all'invasione e metastasi tumorale nell'HCC. Questo miRNA ha come bersaglio EMT, induce la distruzione del citoscheletro cellulare, blocca la via di segnale RhoA/Rock, aumenta l'adesione e reprime l'invasione delle cellule HCC (29).

miR-122 inoltre facilita la replicazione dell'HCV, bersagliando la regione 5' non codificante virale. Infatti questo virus può replicare nelle cellule Huh7, che esprimono questo miRNA, ma non in quelle HepG2 che non lo esprimono. Nei pazienti con HCC con epatite C e cirrosi epatica, miR-122, miR-100 e miR-10a sono iperespressi. miR-122 avrebbe un ruolo chiave nel processo di trasformazione, infatti esso modula l'espressione della ciclina G1 nelle linee cellulari HCC ed esiste una correlazione inversa tra l'espressione di miR-122 e della ciclina G1 nel carcinoma epatico primitivo (62).

# **SEZIONE SPERIMENTALE**

## **2. SCOPO DELLA RICERCA**

I microRNA regolano l'espressione genica a livello post-trascrizionale, essi sono implicati in diversi processi fisiologici quali la proliferazione, la differenziazione (14), la migrazione, l'apoptosi, il controllo del ciclo cellulare (15), l'inibizione della replicazione del virus HBV (16), la regolazione del colesterolo (17) e del metabolismo degli acidi grassi (18), il controllo della risposta immune innata e adattativa (19) e l'autofagia (20). Alcuni microRNA si comportano come oncogeni, vengono pertanto definiti oncomiR, altri agiscono in modo opposto e vengono definiti miR-oncosoppressori, questo dipende dal mRNA bersaglio a cui si legano (21).

Alterazioni della normale via di trasduzione che operano nell'espressione dei miRNA possono avere delle conseguenze sulla fisiologia cellulare e condurre a diversi tipi di patologie, come i tumori (23). Variazioni dei livelli di espressione dei geni che codificano fattori implicati nella via di sintesi e regolazione dei miRNA, quali Drosha, DGCR8, Exportina-5 e Dicer, potrebbero influenzare i livelli dei miRNA e dunque avere un ruolo chiave nello sviluppo dei tumori.

L'HCC rappresenta il quinto tumore più frequente e la terza causa di mortalità per tumore in tutto mondo (63). La prevenzione di questa patologia è limitata dalla mancanza di biomarcatori che permettono una diagnosi precoce e di chemioterapici efficaci.

Lo scopo del presente lavoro è quello di valutare l'espressione dei geni che codificano fattori che intervengono nel processo di sintesi e maturazione dei microRNA.

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

## **3. MATERIALI E METODI**

### **3.1. Campioni utilizzati**

Il nostro studio è stato effettuato su campioni di fegato ottenuti chirurgicamente da pazienti affetti da epatocarcinoma, utilizzando di ciascun paziente il tessuto tumorale e il tessuto circostante la lesione (controllo), apparentemente normale.

I campioni sono stati forniti dal Dipartimento di Chirurgia “Pietro Valdoni”, Università di Roma “La Sapienza”, e dal Dipartimento di Chirurgia di Sassari, previo consenso informato del paziente.

### **3.2. Tecniche utilizzate**

#### **3.2.1. Preparazione istologica**

La colorazione immunostochimica è stata effettuata su campioni di tessuto epatico umano secondo la metodica classica ematossilina-eosina e con la colorazione per CD34, una fosfoglicoproteina transmembrana presente nell’endotelio dei vasi nascenti.

#### **3.2.2. Raccolta dati clinici e istopatologici dei pazienti inclusi nello studio**

##### **1) Estrazione RNA mediante miRNeasy Mini Kit (cod.217004, QIAGEN)**

I campioni, con apposita etichettatura, sono conservati a -80°C in attesa di essere processati per l’estrazione dell’RNA.

Da ciascun frammento di tessuto è stato prelevato un’aliquota del peso di circa 50 mg evitando lo scongelamento, in quanto l’RNA è una molecola molto labile a temperatura ambiente in presenza degli enzimi RNAsi (poco attive a basse temperature) che lo degradano. Questi enzimi infatti non necessitano della presenza di cofattori e resistono a trattamenti drastici quali ebollizione e sterilizzazione in autoclave.

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell’espressione genica nell’epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

Il campione è stato poi omogenizzato per due o tre volte in Qiazol Lysis reagent (soluzione monofasica fenolica contenente guanidina tiocianato) tramite un omogeneizzatore elettrico, l'ultraturrax, avendo cura di non farlo surriscaldare. Sono stati aggiunti successivamente altri 200 µl di Qiazol Lysis Reagent. Tale soluzione ha la capacità di favorire la lisi cellulare, di inibire le RNAsi e rimuovere la maggior parte del DNA cellulare e delle proteine dal lisato. A questo punto si trasferisce tutto per inversione nelle QIAshredder mini spin column in modo tale da rendere il tessuto più omogeneo. Si centrifuga a 10000 rpm per 2 minuti a 4°C. Le colonnine hanno inoltre la capacità di trattenere le soluzioni acquose e rilasciare invece le soluzioni alcoliche.

Al lisato ottenuto viene aggiunta una soluzione acida di cloroformio (140 µl) che insieme al fenolo ha la funzione di allontanare ulteriormente le proteine. Tale miscela va mescolata vigorosamente per circa 15 secondi e centrifugata per 15 minuti a 10000 rpm affinché avvenga la separazione dei diversi componenti cellulari in tre fasi: una fase acquosa contenente RNA, un'interfase contenente proteine insolubili e una fase inferiore organica di colore rosa-rosso in cui sono presenti tutte le altre proteine e lipidi.

Si recupera la fase acquosa superiore contenente l'RNA, la quale viene resa parzialmente alcolica con l'aggiunta di 525 µl di etanolo assoluto (100%) che favorisce il trattenimento dell'RNA totale contenente anche piccoli RNA (microRNA).

Dopo miscelazione, la soluzione viene trasferita in colonnine RNeasy Mini spin (metà volume per volta) che verranno centrifugate a 8000 rpm per 15 secondi a temperatura ambiente (15-25°C). L'RNA totale resta legato alla membrana in silice e verrà poi eluito in acqua RNase-free.

Generalmente il trattamento con la DNasi non è richiesto poiché la combinazione del QIAzol e delle tecnologie RNeasy rimuove efficacemente la maggior parte del DNA. Tuttavia, l'ulteriore rimozione di residui di DNA può esser richiesta da alcune applicazioni che sono sensibili anche a piccole concentrazioni di DNA residuo. In questi casi si procede dispensando 350 µl di Buffer RWT nella colonna di spin

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

RNeasy Mini e centrifugando il tutto per 15 secondi a 10000 rpm per lavare. Si aggiungono poi 80 µl di mix DNasi (costituita da 10 µl di DNasi e 70 µl di buffer RDD per ciascun campione) e si mettono a incubare a 30°C per 15 minuti. Si dispensano poi 350 µl di Buffer RWT nella colonna RNeasy Mini spin e si centrifugano a 10000 rpm per 15 secondi.

Si effettuano poi dei lavaggi per allontanare eventuali contaminanti presenti aggiungendo 500 µl di Buffer RPE e centrifugando ancora una volta per 15 secondi a 10000 rpm. Quest'ultimo passaggio si ripete centrifugando però per 2 minuti, dopo di che si effettua una centrifugazione a vuoto per un minuto. A questo punto si effettuano due eluizioni: la prima dispensando circa 30-50 µl di RNasi-free water direttamente sulla colonna di spin e centrifugando per 1 minuto a 10000 rpm e si ripete l'operazione per effettuare la seconda eluizione.

L'RNA estratto col protocollo illustrato è stato in seguito analizzato con lo spettrofotometro Nanodrop ND-1000 Technologies, Wilmington, DE, USA, in modo da verificare la qualità e la quantità e poi con elettroforesi in gel di agarosio al 2% in TBE 0.5 X. I risultati dell'elettroforesi sono visualizzati in forma digitale che consente la quantificazione e l'analisi dei campioni che hanno una concentrazione di 0.5 µg.

## **2) Preparazione di cDNA per RT-PCR**

L'RNA totale di ciascun campione viene centrifugato a 4°C per un'ora a 10000 rpm. Il surnatante viene eliminato e il pellet risospeso in etanolo al 70%. Viene successivamente centrifugato a 4°C per 30 minuti a 10000 rpm. Il surnatante viene eliminato e il pellet viene messo nella speed vacuum. Lo risospendo con H<sub>2</sub>O DEPC in modo da avere una concentrazione di 0.3 µg di RNA basandomi sulla lettura fatta precedentemente al Nanodrop. L'RNA totale di ciascun campione, diluito a 500 µg con H<sub>2</sub>O DEPC, è stato retrotrascritto utilizzando il kit "High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit" cod.4368813, Life Technologies, Europe.

A ciascun campione di RNA (0.5 µg) viene aggiunta una mix costituita da:

Buffer 10X (cod. 4319981) 5µl

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

dNTP 100mM (cod.4367381) 2  $\mu$ l

Random primers (10X) (cod. 4319979) 5  $\mu$ l

ThermoScientific ribolock RNasi (cod. EO0381) 1  $\mu$ l

Trascrittasi multiscribe (cod. 4319983) 2.5  $\mu$ l

La mix è incubata in Perkin elmer DNA thermal per 10 minuti a 25°C (fase di annealing) e due ore a 37°C (fase di allungamento).

### 3) Real time-PCR

L'analisi PCR è stata effettuata in triplicato tramite Real Time PCR Applied Biosystem 7500/7500 fast real time PCR System. L'analisi degli amplificati è stata effettuata utilizzando il software v2.0.6 di Applied Biosystem, mediante il quale i geni di ciascun campione vengono analizzati rispetto ad un controllo interno rappresentato dal gene 18S.

Per ciascun gene da analizzare viene preparata una mix (in triplicato) in un volume finale di 10  $\mu$ l:

5  $\mu$ l SYBR® Green mix 2x (Qiagen 204143 o 204163).

Primers 20x.

4.5  $\mu$ l di campione.

I cicli di reazione prevedono le seguenti fasi secondo il protocollo consigliato dalla casa costruttrice, il quale consta di un profilo termico suddiviso in 3 stadi (**Fig.10**):

|        | Stage 1         | Stage 2         | Stage 3          |
|--------|-----------------|-----------------|------------------|
|        | Holding Stage   | Cycling Stage   | Melt Curve Stage |
| Step 1 | 50°C per 00:20" | 95°C per 00:15" | 95°C per 00:15"  |
| Step 2 | 95°C per 10:00  | 60°C per 01:00  | 60°C per 01:00   |
| Step 3 |                 |                 | 95°C per 00:30"  |
| Step 4 |                 |                 | 60°C per 00:15"  |

**Fig. 10** Profilo termico di default utilizzato nella RT-PCR

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

Lo strumento è in grado di rilevare la fluorescenza emessa dal SYBR® Green e di registrare la variazione del segnale, all'interno di ogni campione, durante i cicli di amplificazione.

Il SYBR® Green è un fluoroforo che, se viene eccitato da radiazioni elettromagnetiche ad una certa lunghezza d'onda, emette fluorescenza quando è intercalato a qualsiasi DNA a doppio filamento (dsDNA), quali eventuali amplificati aspecifici e dimeri di *primer* che durante la PCR possono prodursi. In questo modo la variazione della fluorescenza ( $\Delta R_n$ ), risulta proporzionale alla quantità di amplificato ottenuto in funzione del numero di cicli.

L'*output* di amplificazione è rappresentato da una curva logaritmica (*amplification plot*), in cui si segue l'andamento di  $\Delta R_n$ : si tiene conto che all'intensità di fluorescenza registrata in ciascun ciclo, viene sottratto un valore relativo al segnale di fondo (*baseline*), corrispondente a piccole variazioni di emissione nelle fasi iniziali di amplificazione.

Attraverso il software v2.0.6., è possibile analizzare ciascun campione di amplificazione, rispetto ad un controllo interno detto "endogeno", in modo che i dati ottenuti siano standardizzati e non dipendenti dalla quantità iniziale del campione.

Si è valutata l'espressione genica con la Real time PCR dei geni: Ki67 (Hs\_MKi\_1\_SG QT00014203 QuantiTect Primer Assay QIAGEN), AKT (Hs\_AKT1\_1\_SG QT00085379 QuantiTect Primer Assay QIAGEN), MDK (Hs\_MDK\_1\_SG QT00014357 QuantiTect Primer Assay QIAGEN), MYBL2 (Hs\_MYBL2\_SG QT00030058 QuantiTect Primer Assay QIAGEN), GNMT (Hs\_GNMT\_1\_SG QT00026285 QuantiTect Primer Assay QIAGEN), PTEN (Hs\_PTEN\_4\_SG QT01676969 QuantiTect Primer Assay QIAGEN), MAT1A (Hs\_Mat1A\_1\_SG QT00038451 QuantiTect Primer Assay QIAGEN), MAT2A (Hs\_Mat2A\_1\_SG QT00232827 QuantiTect Primer Assay QIAGEN), YAP (Hs\_YAP1\_SG QT00080822 QuantiTect Primer Assay QIAGEN), Drosha (Hs\_DROSHA\_1\_SG QT00016520 QuantiTect Primer Assay QIAGEN), DGCR8 (Hs\_DGCR8\_1\_SG QT00086569 QuantiTect Primer Assay QIAGEN), Exportina-5

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

(Hs\_XPO5\_1\_SG QT00040656 QuantiTect Primer Assay QIAGEN) e Dicer (Hs\_DICER1\_1\_SG QT00015176 QuantiTect Primer Assay QIAGEN).

I controlli e i tumori sono stati classificati in base all'espressione del Ki67, una proteina nucleare espressa in tutte le fasi del ciclo cellulare ad eccezione della fase G0 o fase di quiescenza che viene considerata come una stima dell'indice di proliferazione in una popolazione cellulare normale. In base al valore ottenuto del Ki67, i campioni sono stati classificati in controlli ( $Ki67 \leq 0.1$ ), HCC con Ki67 basso ( $Ki67 \leq 1$ ) e HCC con Ki67 alto ( $Ki67 > 1$ ).

### 3.3. Analisi statistica

I valori di espressione dei geni Ki67 (Hs\_MKi\_1\_SG QT00014203 QuantiTect Primer Assay QIAGEN), AKT (Hs\_AKT1\_1\_SG QT00085379 QuantiTect Primer Assay QIAGEN), MDK (Hs\_MDK\_1\_SG QT00014357 QuantiTect Primer Assay QIAGEN), MYBL2 (Hs\_MYBL2\_SG QT00030058 QuantiTect Primer Assay QIAGEN), GNMT (Hs\_GNMT\_1\_SG QT00026285 QuantiTect Primer Assay QIAGEN), PTEN (Hs\_PTEN\_4\_SG QT01676969 QuantiTect Primer Assay QIAGEN), MAT1A (Hs\_Mat1A\_1\_SG QT00038451 QuantiTect Primer Assay QIAGEN), MAT2A (Hs\_Mat2A\_1\_SG QT00232827 QuantiTect Primer Assay QIAGEN), YAP (Hs\_YAP1\_SG QT00080822 QuantiTect Primer Assay QIAGEN), Drosha (Hs\_DROSHA\_1\_SG QT00016520 QuantiTect Primer Assay QIAGEN), DGCR8 (Hs\_DGCR8\_1\_SG QT00086569 QuantiTect Primer Assay QIAGEN), Exportina-5 (Hs\_XPO5\_1\_SG QT00040656 QuantiTect Primer Assay QIAGEN) e Dicer (Hs\_DICER1\_1\_SG QT00015176 QuantiTect Primer Assay (QIAGEN) nei campioni HCC e nei controlli sono stati calcolati con la metodica del  $2^{-\Delta Ct}$ , normalizzando i valori di espressione rispetto a quello del gene *housekeeping* 18S. I geni *housekeeping* sono dei particolari geni costitutivi che sono espressi in ugual misura in tutti i tessuti e in tutte le condizioni. Tali geni di solito codificano proteine e enzimi fondamentali per la vita della cellula.

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

Dopo aver normalizzato i valori, la media dei risultati ottenuti nei campioni tumorali è stata confrontata alla media ottenuta nei campioni di controllo. E così è stato fatto anche per le deviazioni standard.

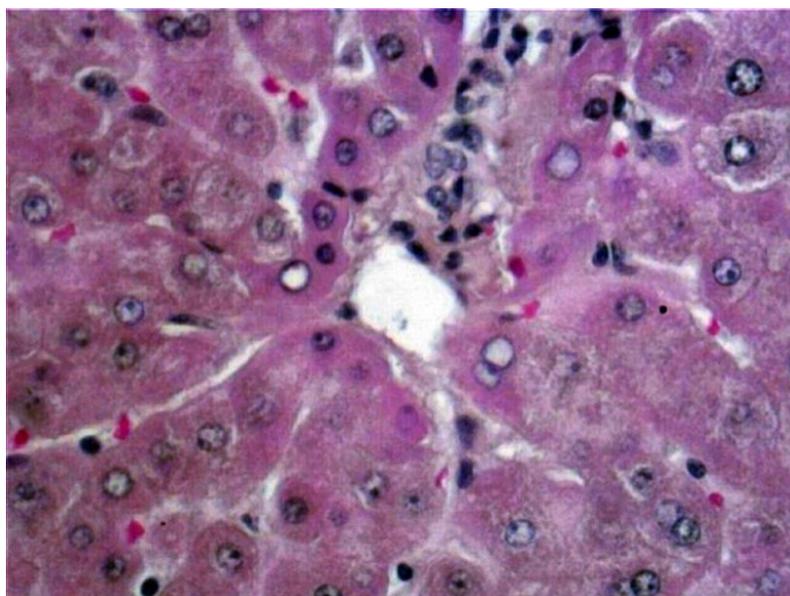
L'analisi della varianza è eseguita mediante il test t di Student per rilevare medie con differenze significative tra i trattamenti ( $P < 0.05$ ).

## 4. RISULTATI

### 4.1. Analisi istologica

Di ciascun campione è stata fatta l'analisi istologica e molecolare.

Dal punto di vista istologico, la colorazione bicromica ematossilina- eosina del tessuto epatico ha permesso una prima distinzione tra il tessuto circostante l'area tumorale (*surrounding*) (**Fig.11**) e il tumore stesso (**Fig.12, 13**).



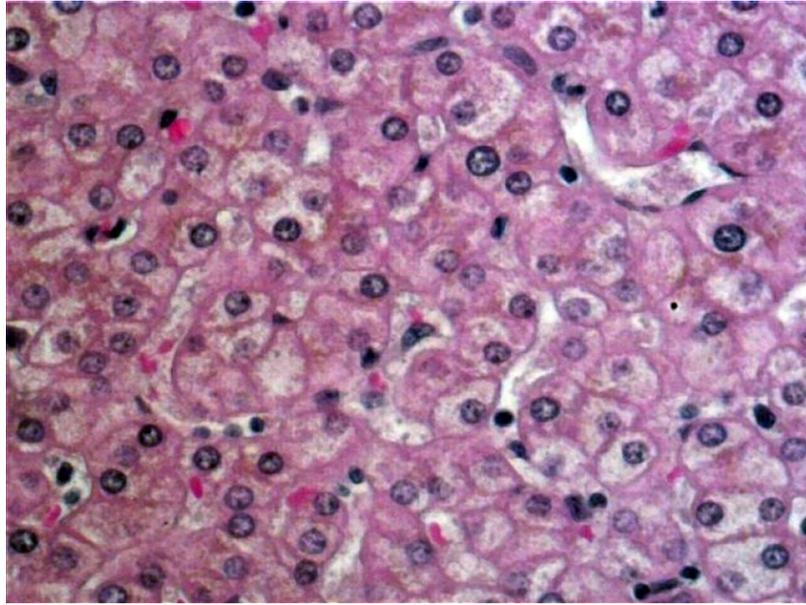
**Fig.11** Fegato apparentemente sano (controllo). Presenti cellule chiare e infiltrazione fibroblastica e linfocitaria.

Dott.ssa Elisa Barattini

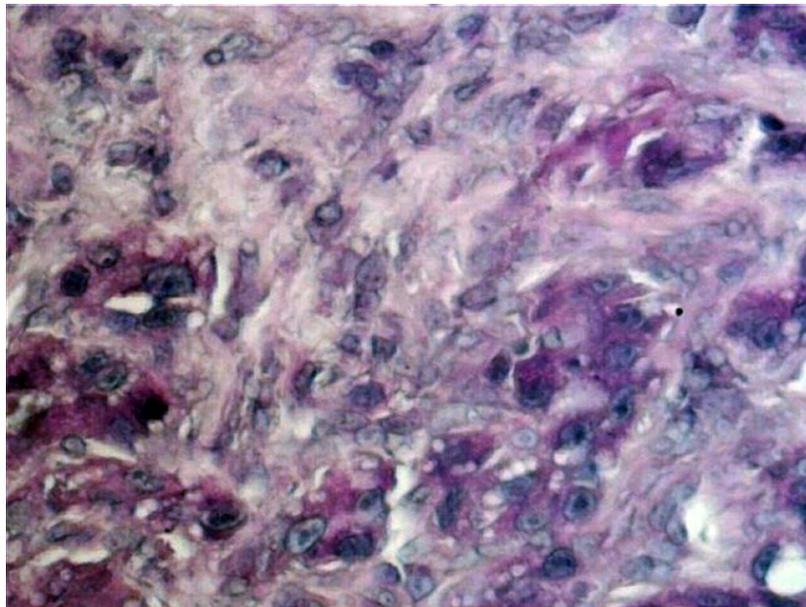
Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari



**Fig.12** HCC con Ki67 basso. Sono presenti aree di compressione, una lieve reazione connettivale e un infiltrato linfocitario.



**Fig.13** HCC con Ki67 alto. Sono presenti tralci fibrotici che invadono e disorganizzano il parenchima, delimitando strutture nodulari contenenti un parenchima con cellule fortemente atipiche per nucleo e dimensioni. Sono presenti zone di necrosi.

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

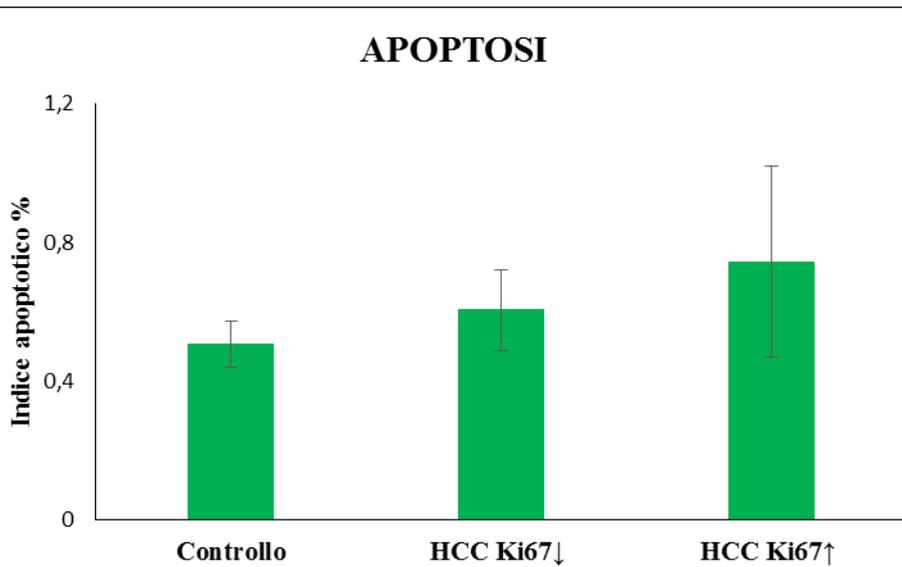
Università degli studi di Sassari

Si osserva che nei controlli l'architettura epatica è conservata e riconoscibile. Nei tumori epatici con Ki 67 basso le cellule mostrano un'iniziale atipia (HCC bene o moderatamente differenziato). Nei tumori con Ki67 alto si osserva perdita totale della struttura epatica e cellule fortemente atipiche (HCC scarsamente differenziato o totalmente indifferenziato).

Sia nei controlli che nei tumori è stato valutato l'indice apoptotico (AI), calcolato mediante conta delle figure apoptotiche ed espresso come percentuale di cellule apoptotiche rispetto al totale delle cellule contate (**Tab.4, Fig.14**).

|                   | <b>Campioni</b>     | <b>% APOPTOSI</b> | <b>Media</b> |
|-------------------|---------------------|-------------------|--------------|
| <b>Controlli</b>  | <b>1710 DFF/S</b>   | 0,584             | (3) 0,507333 |
|                   | <b>1707 DFC/S</b>   | 0,463             | ± 0,066666   |
|                   | <b>1716 DFN/S</b>   | 0,475             |              |
| <b>HCC ↓ Ki67</b> | <b>1859 DOH/HCC</b> |                   | (3) 0,605667 |
|                   | <b>1856 DOE/S</b>   |                   | ± 0,116749   |
|                   | <b>1693 DEL/S</b>   | 0,5               |              |
|                   | <b>1697 DEP/HCC</b> | 0,586             |              |
|                   | <b>1761 DHQ/S</b>   | 0,731             |              |
| <b>HCC ↑ Ki67</b> | <b>1756 DHL/T</b>   | 0,528             | (4) 0,74525  |
|                   | <b>1692 DEI/T</b>   | 1,111             | ± 0,274031   |
|                   | <b>1694 DEM/T</b>   | 0,8               |              |
|                   | <b>1768 DIA/T</b>   | 0,542             |              |

**Tab.4** Indice apoptotico (AI) dei campioni in esame



**Fig.14** Rappresentazione grafica del confronto tra medie geometriche dell'espressione relativa dell'indice apoptotico

Oltre l'indice apoptotico, è stato determinato l'indice angiogenico mediante la valutazione dell'espressione del marcatore CD34<sup>+</sup>, una fosfoglicoproteina transmembrana, nell'endotelio dei vasi nascenti (numero di microvasi, MV, per millimetro<sup>2</sup>) (**Tab.5**).

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

|            | Campioni     | n° MV CD-34 +/-mm <sup>2</sup> |         |           |
|------------|--------------|--------------------------------|---------|-----------|
|            |              | Parenchima                     | Fibrosi | Carcinoma |
| Controlli  | 1710 DFF/S   | 2,35                           | 96,64   |           |
|            | 1707 DFC/S   | 2,12                           | 262,87  |           |
|            | 1716 DFN/S   | 0                              | 114,18  |           |
| HCC ↓Ki67  | 1859 DOH/HCC |                                |         | 0         |
|            | 1856 DOE/S   |                                |         | 0         |
|            | 1693 DEL/S   | 0                              | 120,51  |           |
|            | 1697 DEP/HCC | 0                              | 205,88  |           |
|            | 1761 DHQ/S   | 0                              | 25,88   |           |
| HCC ↑ Ki67 | 1756 DHL/T   |                                | 64,63   | 0         |
|            | 1692 DEI/T   |                                |         | 0         |
|            | 1694 DEM/T   |                                |         | 266,14    |
|            | 1768 DIA/T   |                                |         | 136       |

**Tab.5** Indice angiogenico dei campioni in esame

## 4.2. Analisi molecolare

Oltre l'analisi istologica, è stata fatta l'analisi molecolare. Non sempre i risultati ottenuti in istologia corrispondevano ai valori del Ki67 (di cui parlato in precedenza), cioè un tessuto che dal punto di vista istologico poteva sembrare un controllo, presentava un  $Ki67 \leq 1$ , per cui abbiamo deciso di valutare altri indici di malignità (**Tab.6, Fig.15**).

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

|                   | <b>Campioni</b>     | <b>Ki67</b> | <b>Media</b> |
|-------------------|---------------------|-------------|--------------|
| <b>Controlli</b>  | <b>1710 DFF/S</b>   | 0,012       | (3) 0,014    |
|                   | <b>1707 DFC/S</b>   | 0,011       | ± 0,003589   |
|                   | <b>1716 DFN/S</b>   | 0,018       |              |
| <b>HCC ↓ Ki67</b> | <b>1859 DOH/HCC</b> | 0,844       | (5) 0,475    |
|                   | <b>1856 DOE/S</b>   | 0,457       | ± 0,335453   |
|                   | <b>1693 DEL/S</b>   | 0,117       |              |
|                   | <b>1697 DEP/S</b>   | 0,783       |              |
|                   | <b>1761 DHQ/S</b>   | 0,174       |              |
| <b>HCC ↑ Ki67</b> | <b>1756 DHL/T</b>   | 5,309       | (4) 4,996    |
|                   | <b>1692 DEI/T</b>   | 5,120       | ± 2,607855   |
|                   | <b>1694 DEM/T</b>   | 7,954       |              |
|                   | <b>1768 DIA/T</b>   | 1,599       |              |

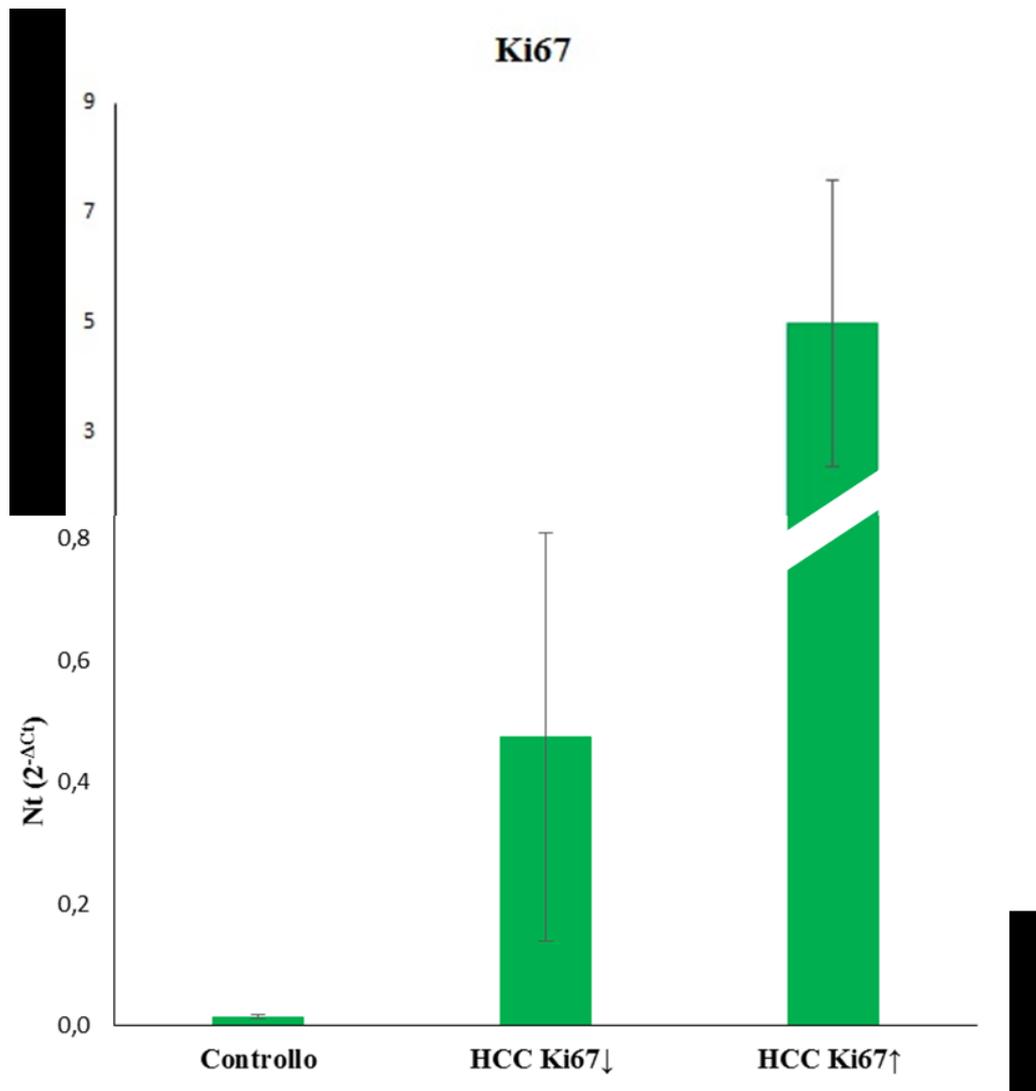
**Tab.6** Risultati RT-PCR nei controlli e negli HCC relativi al gene Ki67

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari



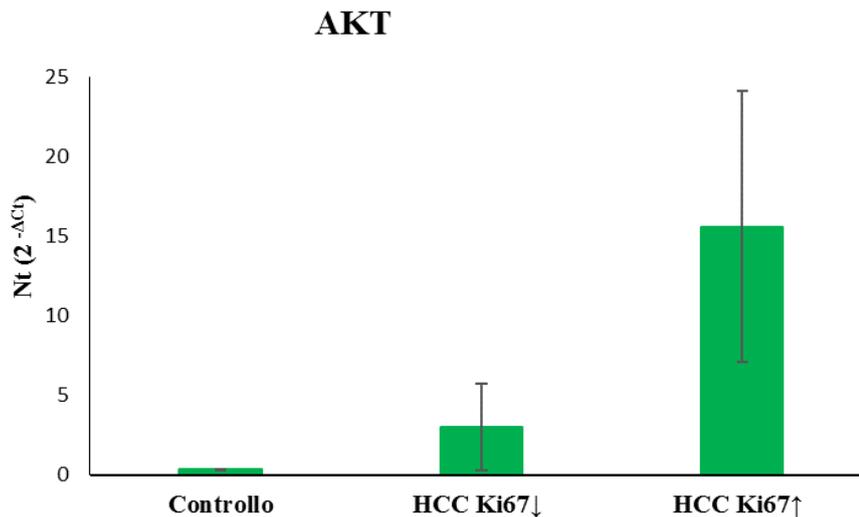
**Fig.15** Rappresentazione grafica del confronto tra le medie geometriche dell'espressione relativa al Ki67 nei controlli e HCC

È stata valutata l'espressione di geni legati alla proliferazione, quali:

- AKT: chinasi serina/treonina citosolica che una volta fosforilata induce la sopravvivenza e la crescita cellulare, l'angiogenesi, e che regola il metabolismo controllando diverse vie biochimiche (**Tab.7, Fig.16**);
- MDK: fattore di crescita legante l'eparina che regola la crescita, la sopravvivenza e la migrazione cellulare (**Tab.8, Fig.17**);
- Mybl2: proteina stimolante la trascrizione di geni che promuovono l'ingresso nelle fasi S e M del ciclo cellulare (**Tab.9, Fig.18**);
- gli oncosoppressori GNMT, enzima abbondante nel citosol della cellula epatica che regola i livelli di SAM, S-adenosil-L-metionina (**Tab.10, Fig.19**), e PTEN, le cui mutazioni del gene sono alla base di molti tumori (**Tab.11, Fig.20**);
- MAT1A (**Tab.12, Fig.21**) e MAT2A (**Tab.13, Fig.22**): metionine adenosiltransferasi che catalizzano la formazione di SAM;
- YAP: fattore nucleare della via Hippo che regola lo sviluppo e il riparo del fegato e la tumorigenesi (**Tab.14, Fig.23**).

|            | Campioni     | AKT    | Media      |
|------------|--------------|--------|------------|
| Controlli  | 1710 DFF/S   | 0,363  | (3) 0,364  |
|            | 1707 DFC/S   | 0,325  | ± 0,039004 |
|            | 1716 DFN/S   | 0,403  |            |
| HCC ↓Ki67  | 1859 DOH/HCC | 1,908  | (5) 2,985  |
|            | 1856 DOE/S   | 7,770  | ± 2,72008  |
|            | 1693 DEL/S   | 1,085  |            |
|            | 1697 DEP/S   | 2,463  |            |
|            | 1761 DHQ/S   | 1,698  |            |
| HCC ↑ Ki67 | 1756 DHL/T   | 27,110 | (4) 15,603 |
|            | 1692 DEI/T   | 16,863 | ± 8,525272 |
|            | 1694 DEM/T   | 10,344 |            |
|            | 1768 DIA/T   | 8,094  |            |

**Tab.7** Risultati RT-PCR nei controlli e negli HCC con Ki67 basso e HCC con Ki67 alto relativi al gene AKT



**Fig.16** Rappresentazione grafica del confronto tra le medie geometriche dell'espressione relativa ad AKT nei controlli e HCC con Ki67 basso e KI67 alto

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

|                  | <b>Campioni</b>     | <b>MDK</b> | <b>Media</b> |
|------------------|---------------------|------------|--------------|
| <b>Controlli</b> | <b>1710 DFF/S</b>   | 0,245      | (3) 0,124    |
|                  | <b>1707 DFC/S</b>   | 0,077      | ± 0,106282   |
|                  | <b>1716 DFN/S</b>   | 0,049      |              |
| <b>HCC ↓Ki67</b> | <b>1859 DOH/HCC</b> | 0,547      | (5) 0,492    |
|                  | <b>1856 DOE/S</b>   | 0,343      | ± 0,20805    |
|                  | <b>1693 DEL/S</b>   | 0,828      |              |
|                  | <b>1697 DEP/S</b>   | 0,317      |              |
|                  | <b>1761 DHQ/S</b>   | 0,425      |              |
| <b>HCC ↑Ki67</b> | <b>1756 DHL/T</b>   | 34,083     | (4) 26,644   |
|                  | <b>1692 DEI/T</b>   | 34,373     | ± 8,804477   |
|                  | <b>1694 DEM/T</b>   | 20,162     |              |
|                  | <b>1768 DIA/T</b>   | 17,957     |              |

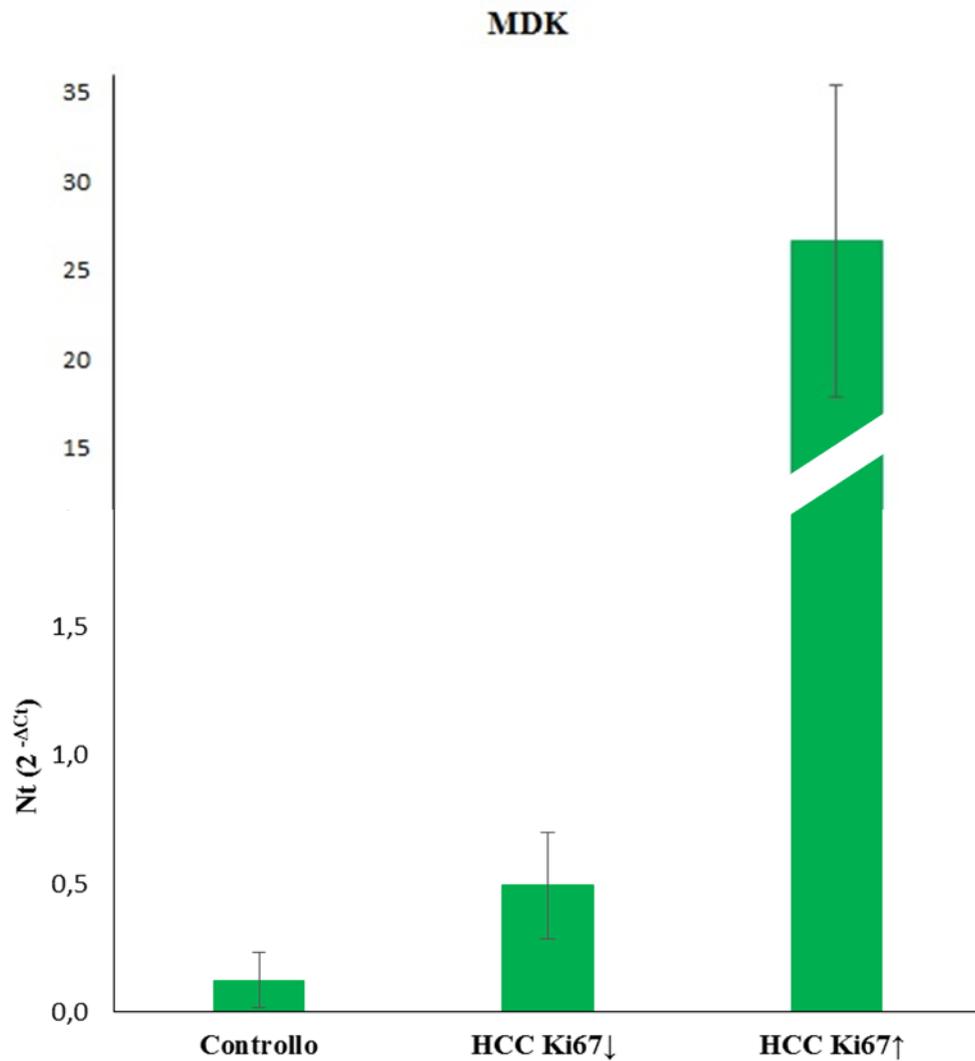
**Tab.8** Risultati RT-PCR nei controlli e negli HCC con Ki67 basso e HCC con Ki67 alto relativi al gene MDK

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari



**Fig.17** Rappresentazione grafica del confronto tra le medie geometriche dell'espressione relativa a MDK nei controlli e HCC con Ki67 basso e KI67 alto

Dott.ssa Elisa Barattini

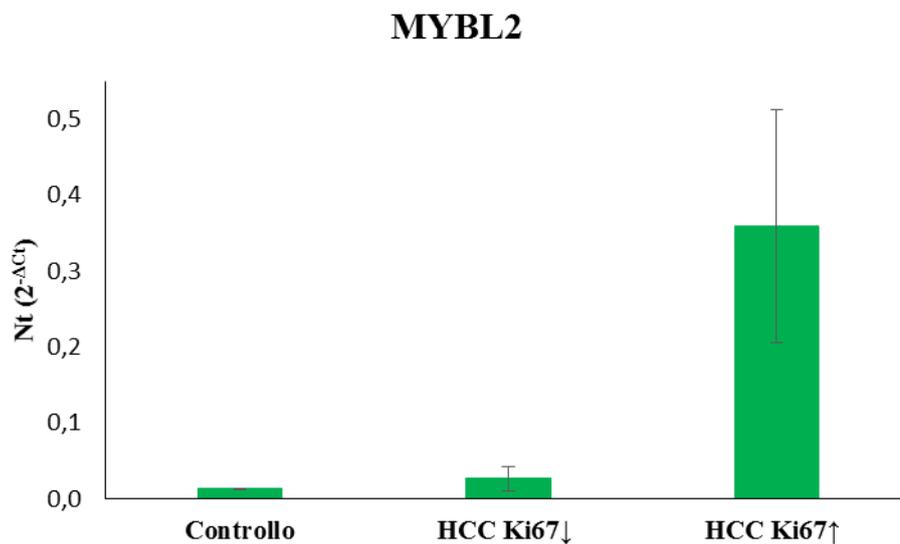
Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

|           | Campioni     | MYBL2 | Media      |
|-----------|--------------|-------|------------|
| Controlli | 1710 DFF/S   | 0,013 | (3) 0,013  |
|           | 1707 DFC/S   | 0,012 | ± 0,001    |
|           | 1716 DFN/S   | 0,014 |            |
| HCC ↓Ki67 | 1859 DOH/HCC | 0,048 | (5) 0,026  |
|           | 1856 DOE/S   | 0,023 | ± 0,015754 |
|           | 1693 DEL/S   | 0,036 |            |
|           | 1697 DEP/S   | 0,014 |            |
|           | 1761 DHQ/S   | 0,010 |            |
| HCC ↑Ki67 | 1756 DHL/T   | 0,459 | (4) 0,359  |
|           | 1692 DEI/T   | 0,394 | ± 0,153585 |
|           | 1694 DEM/T   | 0,451 |            |
|           | 1768 DIA/T   | 0,133 |            |

**Tab.9** Risultati RT-PCR nei controlli e negli HCC con Ki67 basso e HCC con Ki67 alto relativi al gene MYBL2



**Fig.18** Rappresentazione grafica del confronto tra le medie geometriche dell'espressione relativa a MYBL2 nei controlli e HCC con Ki67 basso e KI67 alto

Dott.ssa Elisa Barattini

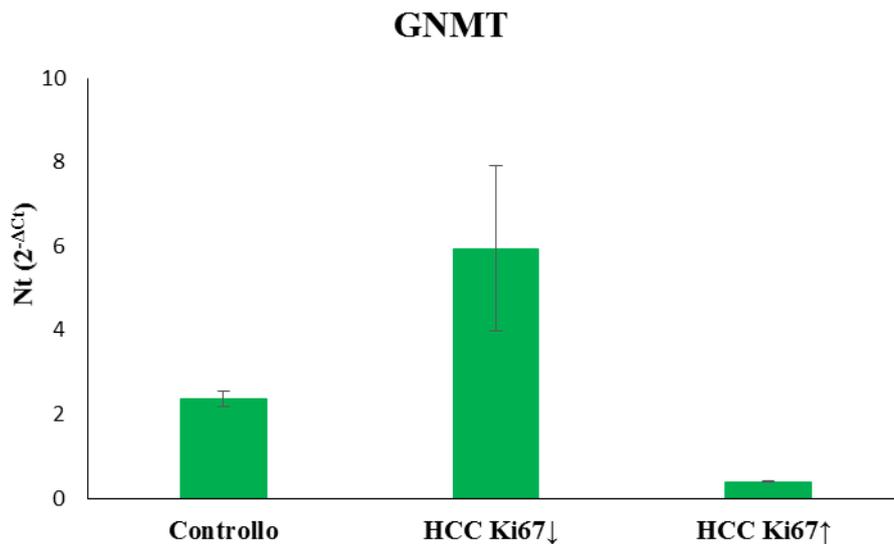
Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

|           | Campioni     | GNMT  | Media      |
|-----------|--------------|-------|------------|
| Controlli | 1710 DFF/S   | 2,579 | (3) 2,366  |
|           | 1707 DFC/S   | 2,240 | ± 0,185727 |
|           | 1716 DFN/S   | 2,278 |            |
| HCC ↓Ki67 | 1859 DOH/HCC | 7,911 | (5) 5,937  |
|           | 1856 DOE/S   | 5,769 | ± 1,963233 |
|           | 1693 DEL/S   | 2,702 |            |
|           | 1697 DEP/S   | 6,615 |            |
|           | 1761 DHQ/S   | 6,690 |            |
| HCC ↑Ki67 | 1756 DHL/T   | 0,403 | (4) 0,386  |
|           | 1692 DEI/T   | 0,377 | ± 0,015521 |
|           | 1694 DEM/T   | 0,394 |            |
|           | 1768 DIA/T   | 0,369 |            |

**Tab.10** Risultati RT-PCR nei controlli e negli HCC con Ki67 basso e HCC con Ki67 alto relativi al gene GNMT



**Fig.19** Rappresentazione grafica del confronto tra le medie geometriche dell'espressione relativa a GNMT nei controlli e HCC con Ki67 basso e KI67 alto

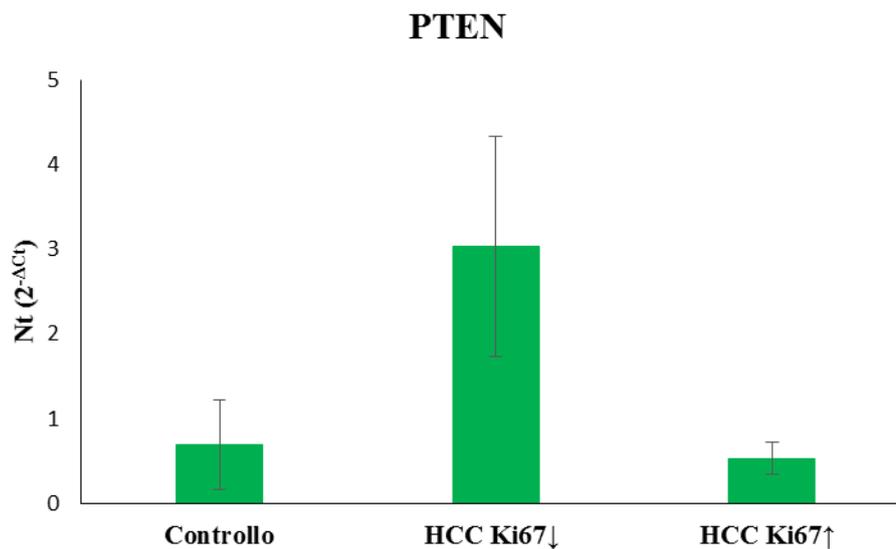
Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana  
Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

|           | Campioni     | PTEN  | Media      |
|-----------|--------------|-------|------------|
| Controlli | 1710 DFF/S   | 1,307 | (3) 0,699  |
|           | 1707 DFC/S   | 0,350 | ± 0,528708 |
|           | 1716 DFN/S   | 0,439 |            |
| HCC ↓Ki67 | 1859 DOH/HCC | 2,414 | (5) 3,036  |
|           | 1856 DOE/S   | 5,027 | ± 1,295018 |
|           | 1693 DEL/S   | 1,880 |            |
|           | 1697 DEP/S   | 3,636 |            |
|           | 1761 DHQ/S   | 2,223 |            |
| HCC ↑Ki67 | 1756 DHL/T   | 0,521 | (4) 0,534  |
|           | 1692 DEI/T   | 0,343 | ± 0,185525 |
|           | 1694 DEM/T   | 0,787 |            |
|           | 1768 DIA/T   | 0,483 |            |

**Tab.11** Risultati RT-PCR nei controlli e negli HCC con Ki67 basso e HCC con Ki67 alto relativi al gene PTEN



**Fig.20** Rappresentazione grafica del confronto tra le medie geometriche dell'espressione relativa a PTEN nei controlli e HCC con Ki67 basso e KI67 alto

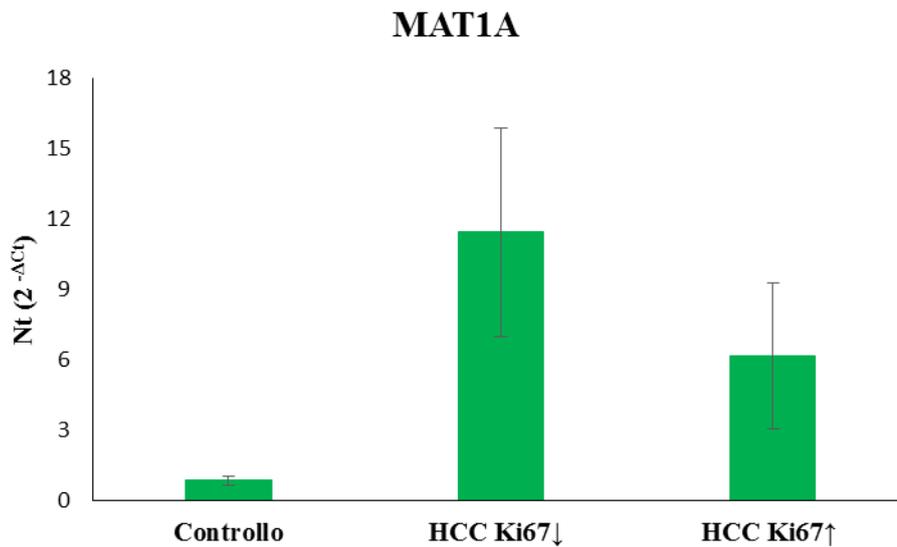
Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana  
Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

|           | Campioni     | MAT1A  | Media      |
|-----------|--------------|--------|------------|
| Controlli | 1710 DFF/S   | 0,940  | (3) 0,897  |
|           | 1707 DFC/S   | 0,760  | ± 0,120968 |
|           | 1716 DFN/S   | 0,990  |            |
| HCC ↓Ki67 | 1859 DOH/HCC | 18,020 | (5) 11,919 |
|           | 1856 DOE/S   | 16,830 | ± 5,48677  |
|           | 1693 DEL/S   | 8,441  |            |
|           | 1697 DEP/S   | 5,102  |            |
|           | 1761 DHQ/S   | 11,203 |            |
| HCC ↑Ki67 | 1756 DHL/T   | 9,420  | (3) 7,499  |
|           | 1692 DEI/T   |        | ± 2,814989 |
|           | 1694 DEM/T   | 4,268  |            |
|           | 1768 DIA/T   | 8,810  |            |

**Tab.12** Risultati RT-PCR nei controlli e negli HCC con Ki67 basso e HCC con Ki67 alto relativi al gene MAT1A



**Fig.21** Rappresentazione grafica del confronto tra le medie geometriche dell'espressione relativa a MAT1A nei controlli e HCC con Ki67 basso e KI67 alto

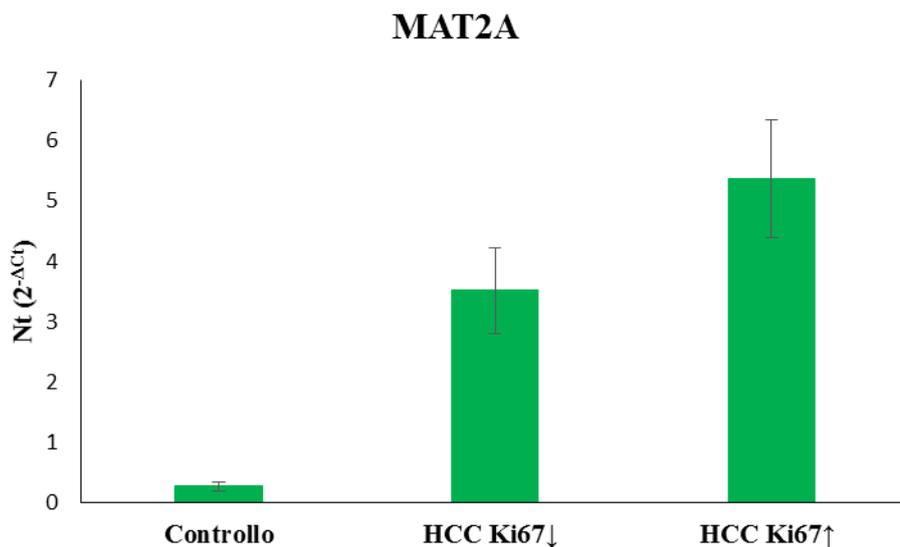
Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana  
Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

|           | Campioni     | MAT2A | Media      |
|-----------|--------------|-------|------------|
| Controlli | 1710 DFF/S   | 0,186 | (3) 0,264  |
|           | 1707 DFC/S   | 0,279 | ± 0,071248 |
|           | 1716 DFN/S   | 0,326 |            |
| HCC ↓Ki67 | 1859 DOH/HCC | 4,134 | (5) 3,511  |
|           | 1856 DOE/S   | 2,820 | ± 0,716953 |
|           | 1693 DEL/S   | 2,762 |            |
|           | 1697 DEP/S   | 3,536 |            |
|           | 1761 DHQ/S   | 4,304 |            |
| HCC ↑Ki67 | 1756 DHL/T   | 6,457 | (3) 5,366  |
|           | 1692 DEI/T   |       | ± 0,97851  |
|           | 1694 DEM/T   | 4,566 |            |
|           | 1768 DIA/T   | 5,075 |            |

**Tab.13** Risultati RT-PCR nei controlli e negli HCC con Ki67 basso e HCC con Ki67 alto relativi al gene MAT2A



**Fig.22** Rappresentazione grafica del confronto tra le medie geometriche dell'espressione relativa a MAT2A nei controlli e HCC con Ki67 basso e KI67 alto

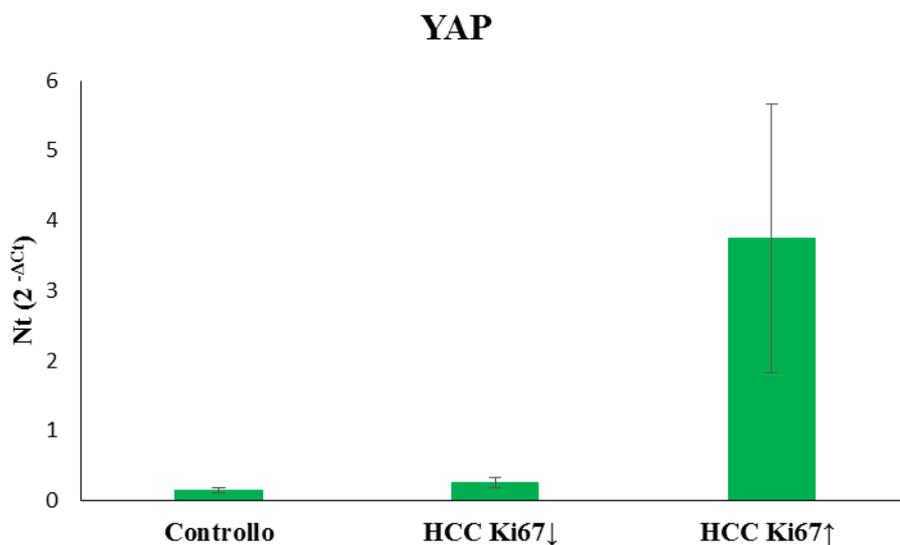
Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana  
Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

|           | Campioni     | YAP   | Media      |
|-----------|--------------|-------|------------|
| Controlli | 1710 DFF/S   | 0,184 | (3) 0,144  |
|           | 1707 DFC/S   | 0,131 | ± 0,035135 |
|           | 1716 DFN/S   | 0,117 |            |
| HCC ↓Ki67 | 1859 DOH/HCC | 0,287 | (5) 0,257  |
|           | 1856 DOE/S   | 0,297 | ± 0,076798 |
|           | 1693 DEL/S   | 0,298 |            |
|           | 1697 DEP/S   | 0,284 |            |
|           | 1761 DHQ/S   | 0,120 |            |
| HCC ↑Ki67 | 1756 DHL/T   | 2,716 | (4) 3,743  |
|           | 1692 DEI/T   | 1,870 | ± 1,9198   |
|           | 1694 DEM/T   | 6,263 |            |
|           | 1768 DIA/T   | 4,122 |            |

**Tab.14** Risultati RT-PCR nei controlli e negli HCC con Ki67 basso e HCC con Ki67 alto relativi al gene YAP



**Fig.23** Rappresentazione grafica del confronto tra le medie geometriche dell'espressione relativa a YAP nei controlli e HCC con Ki67 basso e KI67 alto

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana  
Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

I valori di espressione di questi geni nei campioni HCC e nei controlli sono stati calcolati con la metodica del  $2^{-\Delta Ct}$ , normalizzando i valori di espressione rispetto al gene *housekeeping* 18S.

Dopo aver normalizzato i valori, sono stati valutati i rapporti tra tessuto tumorale rispetto al controllo.

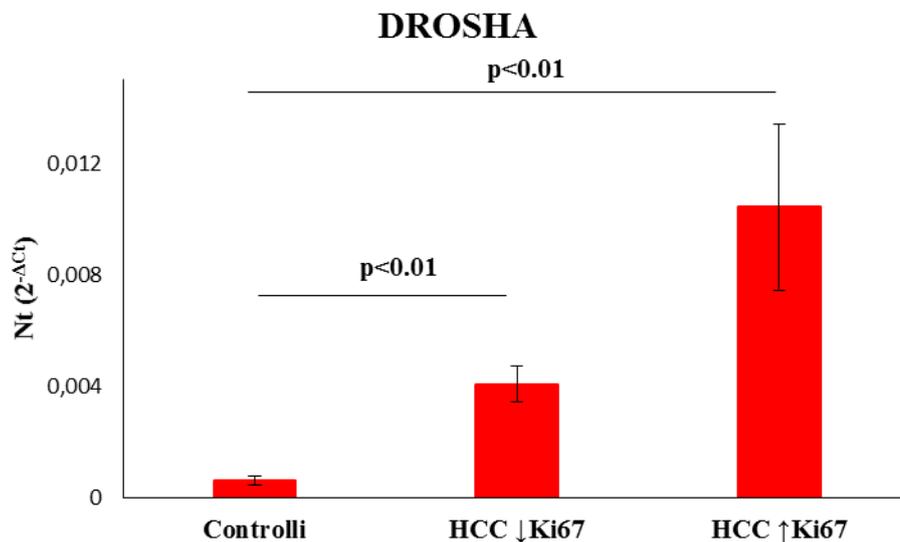
Una volta valutati tutti questi parametri e classificato dunque i nostri campioni, abbiamo valutato l'espressione dei geni coinvolti nel processo di sintesi e maturazione dei microRNA.

Le condizioni di partenza per i geni Droscha, DGCR8, Exportina-5 e Dicer sono state differenti: per Droscha, Exportina-5 e Dicer i campioni sono stati diluiti 1:10, mentre il 18S è stato diluito 1:15 a partire dal 20x. Mentre per DGCR8 la situazione è stata differente, in quanto questo gene ci dava valori di Ct molto alti, per cui abbiamo deciso di fare dei preamplificati 2cicli+40 partendo da campioni diluiti 1:10 per DGCR8, mentre il primer del 18S è stato diluito 1:12 a partire dal 20x e i campioni diluiti 1:8000.

Le variazioni di espressione di Droscha sono statisticamente significative. I livelli di questo gene aumentano notevolmente passando dai controlli ai campioni con Ki67 basso, e sono notevolmente aumentati nei campioni con Ki67 alto, dunque sembrerebbe che l'alta espressione di Droscha sia significativamente associata con il fenotipo tumorale più aggressivo ( $p < 0,01$ ) (**Tab.15, Fig.24**).

|            | Campioni     | Drosha   | Media        |
|------------|--------------|----------|--------------|
| Controlli  | 1710 DFF/S   | 0,000763 | (3) 0,000626 |
|            | 1707 DFC/S   | 0,000441 | ± 0,000166   |
|            | 1716 DFN/S   | 0,000675 |              |
| HCC ↓ Ki67 | 1859 DOH/HCC | 0,004772 | (5) 0,004065 |
|            | 1856 DOE/S   | 0,004019 | ± 0,000647   |
|            | 1693 DEL/S   | 0,003916 |              |
|            | 1697 DEP/HCC | 0,003095 |              |
|            | 1761 DHQ/S   | 0,004522 |              |
| HCC ↑ Ki67 | 1756 DHL/T   | 0,010174 | (4) 0,011169 |
|            | 1692 DEI/T   | 0,013733 | ± 0,002995   |
|            | 1694 DEM/T   | 0,007375 |              |
|            | 1768 DIA/T   | 0,013395 |              |

**Tab.15** Risultati RT-PCR nei controlli e negli HCC con Ki67 basso e HCC con Ki67 alto relativi al gene Drosha



**Fig.24** Rappresentazione grafica del confronto tra le medie geometriche dell'espressione relativa a DROSHA nei controlli e HCC con Ki67 basso e KI67 alto

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocancerogenesi umana

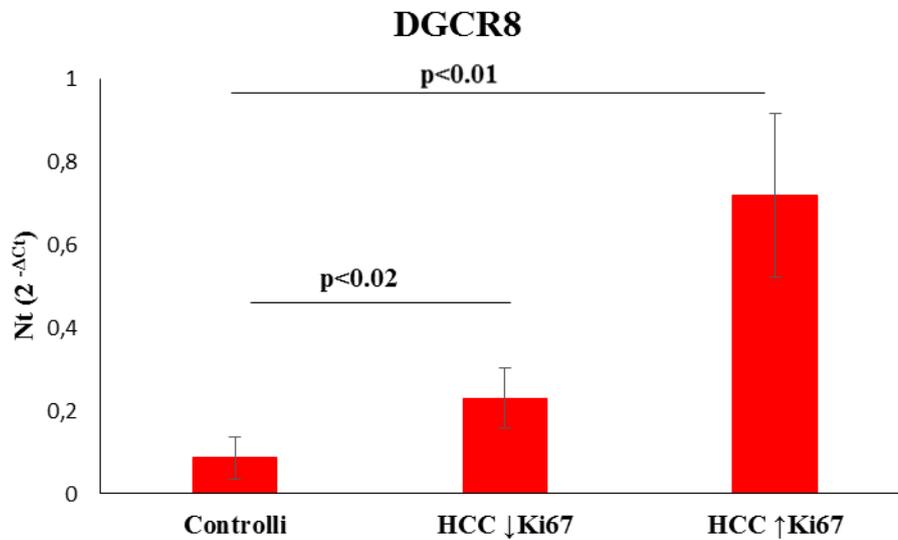
Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

Anche i livelli di espressione del gene DGCR8 sono significativamente aumentati e la differenza è particolarmente significativa confrontando i controlli con i campioni HCC con Ki67 alto (**Tab.16, Fig.25**).

|            | Campioni     | DGCR8    | Media        |
|------------|--------------|----------|--------------|
| Controlli  | 1710 DFF/S   | 0,100781 | (3) 0,086276 |
|            | 1707 DFC/S   | 0,031186 | ± 0,049459   |
|            | 1716 DFN/S   | 0,126861 |              |
| HCC ↓ Ki67 | 1859 DOH/HCC | 0,243857 | (5) 0,229984 |
|            | 1856 DOE/S   | 0,135676 | ± 0,072079   |
|            | 1693 DEL/S   | 0,229800 |              |
|            | 1697 DEP/HCC | 0,310604 |              |
|            | 1761 DHQ/S   | 0,222865 |              |
| HCC ↑ Ki67 | 1756 DHL/T   | 0,718451 | (4) 0,718364 |
|            | 1692 DEI/T   | 0,515419 | ± 0,195914   |
|            | 1694 DEM/T   | 0,983171 |              |
|            | 1768 DIA/T   | 0,656415 |              |

**Tab.16** Risultati RT-PCR nei controlli e negli HCC con Ki67 basso e HCC con Ki67 alto relativi al gene DGCR8



**Fig.25** Rappresentazione grafica del confronto tra le medie geometriche dell'espressione relativa a DGCR8 nei controlli e HCC con Ki67 basso e KI67 alto

I livelli di espressione del gene exportina-5 sono significativamente aumentati. La differenza è particolarmente significativa già confrontando i controlli con i campioni HCC con Ki67 basso, infatti  $p < 0,01$  (**Tab.17, Fig.26**).

Dott.ssa Elisa Barattini

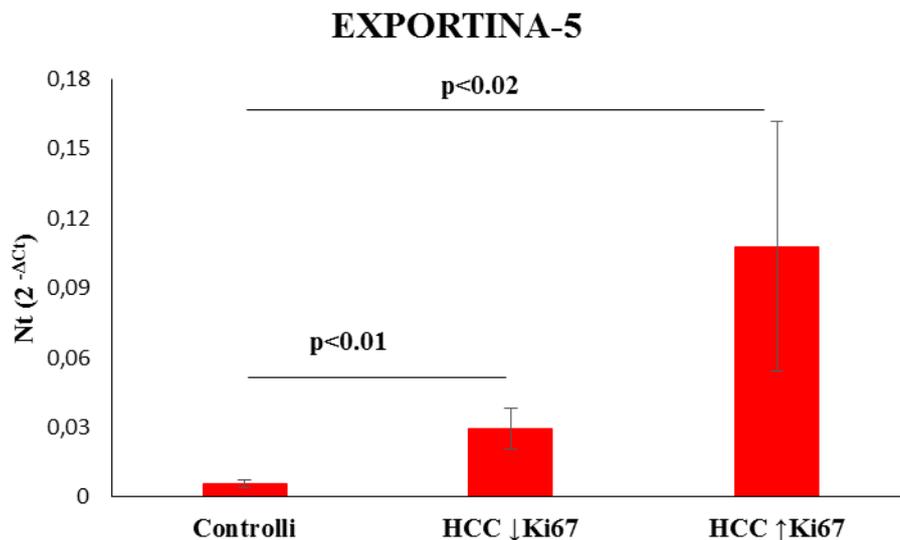
Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

|           | Campioni     | Xpo-5    | Media        |
|-----------|--------------|----------|--------------|
| Controlli | 1710 DFF/S   | 0,007472 | (3) 0,005704 |
|           | 1707 DFC/S   | 0,004728 | ± 0,001533   |
|           | 1716 DFN/S   | 0,004913 |              |
| HCC ↓Ki67 | 1859 DOH/HCC | 0,023502 | (5) 0,029370 |
|           | 1856 DOE/S   | 0,038277 | ± 0,008745   |
|           | 1693 DEL/S   | 0,031718 |              |
|           | 1697 DEP/S   | 0,035954 |              |
|           | 1761 DHQ/S   | 0,017401 |              |
| HCC ↑Ki67 | 1756 DHL/T   | 0,066699 | (4) 0,107739 |
|           | 1692 DEI/T   | 0,11956  | ± 0,053778   |
|           | 1694 DEM/T   | 0,065667 |              |
|           | 1768 DIA/T   | 0,179029 |              |

**Tab.17** Risultati RT-PCR nei controlli e negli HCC con Ki67 basso e HCC con Ki67 alto relativi al gene Exportina-5



**Fig.26** Rappresentazione grafica del confronto tra le medie geometriche dell'espressione relativa a Exportina-5 nei controlli e HCC con Ki67 basso e KI67 alto

Dott.ssa Elisa Barattini

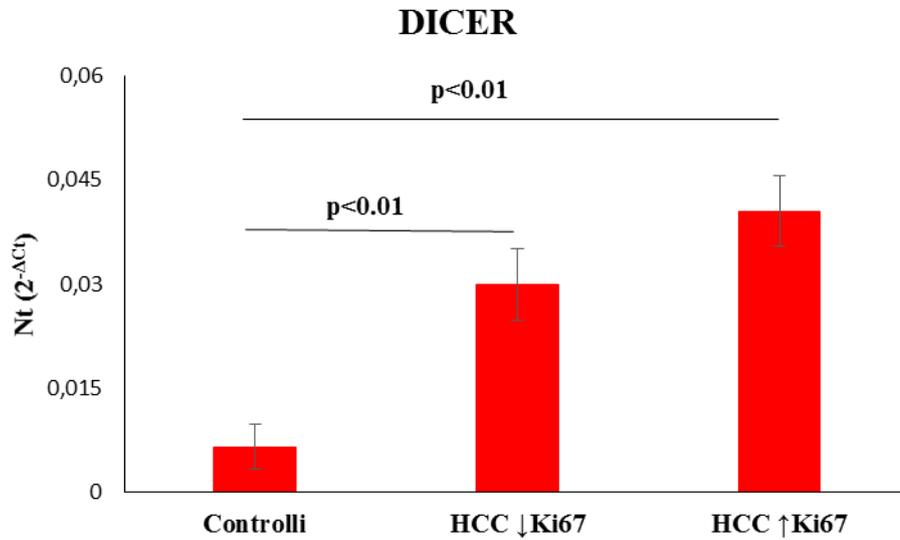
Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana  
Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

Invece per quanto riguarda i livelli di espressione del gene Dicer sono risultati significativamente più alti rispetto ai tessuti affetti da HCC sia con Ki67 basso che alto (Tab.18, Fig.27).

|                   | Campioni     | Dicer    | Media        |
|-------------------|--------------|----------|--------------|
| <b>Controlli</b>  | 1710 DFF/S   | 0,009148 | (3) 0,006512 |
|                   | 1707 DFC/S   | 0,002897 | ± 0,003238   |
|                   | 1716 DFN/S   | 0,00749  |              |
| <b>HCC ↓ Ki67</b> | 1859 DOH/HCC | 0,02779  | (5) 0,029970 |
|                   | 1856 DOE/S   | 0,026617 | ± 0,005179   |
|                   | 1693 DEL/S   | 0,035988 |              |
|                   | 1697 DEP/S   | 0,034969 |              |
|                   | 1761 DHQ/S   | 0,024486 |              |
| <b>HCC ↑ Ki67</b> | 1756 DHL/T   | 0,036816 | (4) 0,040466 |
|                   | 1692 DEI/T   | 0,039908 | ± 0,005079   |
|                   | 1694 DEM/T   | 0,03733  |              |
|                   | 1768 DIA/T   | 0,047808 |              |

**Tab.18** Risultati RT-PCR nei controlli e negli HCC con Ki67 basso e HCC con Ki67 alto relativi al gene Dicer



**Fig.27** Rappresentazione grafica del confronto tra le medie geometriche dell'espressione relativa a Dicer nei controlli e HCC con Ki67 basso e KI67 alto

## 5. CONCLUSIONI

Espressione anomala dei miRNA è stata riscontrata in diversi tumori ematologici e solidi, tra cui l'HCC (64).

Aberrazioni nella loro biogenesi portano a un'espressione anomala di molteplici miRNA, che possono contribuire alla progressione del tumore (65).

Nel presente lavoro, abbiamo valutato l'espressione dei geni che sono coinvolti nella via di biosintesi e di maturazione dei miRNA, quali Drosha, DGCR8, Exportina-5 e Dicer, abbiamo usato campioni di carcinoma epatocellulare confrontati coi controlli. A tal fine sono state eseguite diverse RT-PCR.

Ciascun campione retroscritto è stato caricato in triplicato, al fine di ottenere una buona riproducibilità del risultato.

Drosha è risultato significativamente aumentato, quasi 18 volte negli HCC con Ki67 alto rispetto ai controlli ed è solo raddoppiato rispetto agli HCC con Ki67 basso; questo fa pensare che esso intervenga negli stadi più avanzati del tumore.

In letteratura è riportato che un incremento di espressione di Drosha è associato ad un aumento della proliferazione cellulare e ad una prognosi scarsa nei pazienti con carcinoma cellulare squamoso cervicale (SCC) esofageo (66). Inoltre alti livelli di questo enzima sono stati trovati anche nel carcinoma della vescica, in cui ne promuove lo sviluppo (67) e nel carcinoma ovarico sieroso la progressione (68).

DGCR8 insieme a Drosha e ad altre proteine quali p68 (DDX5) e p72 (DDX17) forma un complesso noto come microprocessore. La proteina p72 è controllata da Yes Associated-Protein, YAP, un bersaglio a valle della via oncosoppressiva Hippo. A bassa densità cellulare, la via Hippo è soppressa e YAP nucleare può così legare la proteina p72, sequestrandola. Mentre ad alta densità cellulare, YAP risulta inattivo ed è fosforilato e sequestrato nel citoplasma. Di conseguenza p72 non si lega più a YAP e può associarsi al microprocessore e riconoscere un motivo di sequenza VCAUCH nella regione fiancheggiante 3' del pri-miRNA (69).

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

Dai risultati ottenuti, DGCR8 ha mostrato un significativo aumento nei campioni HCC rispetto ai controlli. In bibliografia è riportato che questo gene aumenta anche nel carcinoma tiroideo midollare che presenta mutazione nell'oncogene RET (65).

Exportina-5 è uno dei geni meno studiati, infatti in letteratura si trova poco in merito a questo trasportatore. Nonostante tutto, questa proteina è fondamentale nella biogenesi dei miRNA, in quanto trasporta i pre-miRNA nel citosplasma. Nel nostro lavoro, i livelli di espressione di questo gene sono aumentati di ben 19 volte nei campioni HCC con Ki67 alto rispetto ai controlli.

Infine, ma non meno importante, è stata valutata l'espressione del gene Dicer. Esso è aumentato di 6 volte nei campioni HCC con Ki67 alto e di 4 volte nei campioni HCC con Ki67 basso rispetto ai controlli. Dicer è uno dei geni coinvolti nel processo di maturazione dei miRNA ad essere più studiato. In bibliografia è riportato che esso aumenta nell'iperplasia adenomatosa atipica (AAH), nel carcinoma bronchioloalveolare (BAC) (70), nella leucemia mieloide acuta, AML (71) e nel carcinoma della tiroide midollare (65).

La mancata regolazione di espressione di Dicer sembrerebbe collegata all'aggressività e alla metastasi dei tumori (71).

Dicer oltre a esser importante nella biogenesi dei miRNA, può contribuire alla trasformazione maligna. È stato dimostrato che è essenziale per mantenere l'ipermetilazione delle isole CpG nel promotore nelle linee cellulari di cancro coloretale umane (72). Kitagawa N e i suoi colleghi hanno mostrato che DGCR8 e Dicer sono aumentate nell'HCC (73), forse la differenza dei risultati è dovuta al fatto che loro hanno normalizzato i risultati ottenuti con la gliceraldeide 3'-fosfato deidrogenasi GAPDH, mentre noi abbiamo usato il 18S.

Il nostro è un lavoro preliminare. I dati da noi ottenuti rappresentano risultati preliminari del nostro studio e altri esperimenti sono in programma al fine di confermare i nostri risultati.

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

In conclusione, i dati da noi ottenuti indicano che vi è un aumento significativo dell'espressione dei geni coinvolti nella sintesi e nella maturazione dei miRNA nel carcinoma epatocellulare.

È auspicabile che questi geni potrebbero diventare dei buoni marcatori o dei validi bersagli molecolari nelle terapie antitumorali.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Ya-Kai Huang, Jian-Chun Yu. Circulating microRNAs and long non-coding RNAs in gastric cancer diagnosis: An update and review. *World J Gastroenterol* 2015 September 14; 21(34): 9863-9886
- 2) Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15, 509–524 (2014) doi:10.1038/nrm3838
- 3) Macfarlane LA, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Current Genomics*. 2010 Nov;11(7):537-61. doi: 10.2174/138920210793175895
- 4) Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3'UTR. *PNAS* June 5, 2007 vol. 104 no. 23 9667–9672
- 5) Acunzo M, Romano G1, Wernicke D, Croce CM. MicroRNA and cancer – A brief overview. *Advances in Biological Regulation*. 2015 Jan;57:1-9. doi: 10.1016/j.jbior.2014.09.013
- 6) Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, et al. 2003. A uniform system for microRNA annotation. *RNA*. 9(3):277-9
- 7) Vrijens K, Bollati V, Nawrot TS. MicroRNAs as Potential Signatures of Environmental Exposure or Effect: A Systematic Review. *Environmental Health Perspectives*. 2015 Jan 16. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1408459>
- 8) Liu B, Fang L, Chen J, Liu F, Wang X. miRNA-dis: microRNA precursor identification based on distance structure status pairs. *Molecular Biosystems* 2015 Mar 17;11(4):1194-1204
- 9) Ambrosio MR, Navari M, Di Lisio L, Leon EA, Onnis A, Gazaneo S, Mundo L, Ulivieri C, Gomez G, Lazzi S, Piris MA, Leoncini L, De Falco G. The Epstein Barr-encoded BART-6-3p microRNA affects regulation of cell growth and immuno response in Burkitt lymphoma. *Infect Agent Cancer*. 2014 Apr 14;9:12. doi: 10.1186/1750-9378-9-12

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

- 10) Hammond SM. An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015 Jun 29;87:3-14. doi: 10.1016/j.addr.2015.05.001. Epub 2015 May 12
- 11) O'Connell, Dinesh S. Rao, Aadel A. Chaudhuri and David Baltimore. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010 Feb;10(2):111-22. doi: 10.1038/nri2708
- 12) Deiuliis JA. MicroRNAs as regulators of metabolic disease: Pathophysiologic significance and emerging role as biomarkers and therapeutics. *Int J Obes (Lond).* 2015 Aug 27. doi: 10.1038/ijo.2015.170
- 13) Changchun Xiao, Dinis Pedro Calado, Gunther Galler, To-Ha Thai, Heide Christine Patterson, Jing Wang, Nikolaus Rajewsky, Timothy P. Bender, Klaus Rajewsky. MiR-150 Controls B Cell Differentiation by Targeting the Transcription Factor c-Myb. *Cell.* 2007 Oct 5;131(1):146-59
- 14) Poos K, Smida J, Nathrath M, Maugg D, Baumhoer D, Korsching E. How MicroRNA and Transcription Factor Co-regulatory Networks Affect Osteosarcoma Cell Proliferation. *Plos Computational biology* DOI: 10.1371/journal.pcbi
- 15) Wojcicka A, Swierniak M, Kornasiewicz O, Gierlikowski W, Maciag M, Kolanowska M, Kotlarek M, Gornicka B, Koperski L, Niewinski G, Krawczyk M, Jazdzewski K. Next generation sequencing reveals microRNA isoforms in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* Volume 53, August 2014, Pages 208–217 doi: 10.1016/j.biocel.2014.05.020
- 16) Hu W, Wang X, Ding X, Li Y, Zhang X, Xie P, Yang J, Wang S. MicroRNA-141 represses HBV replication by targeting PPARA. *PLoS One.* 2012;7(3):e34165. doi: 10.1371/journal.pone.0034165
- 17) Sun C, Huang F, Liu X, Xiao X, Yang M, Hu G, Liu H, Liao L. miR-21 regulates triglyceride and cholesterol metabolism in non-alcoholic fatty liver disease by targeting HMGCR. *Int J Mol Med.* 2015 Mar;35(3):847-53. doi: 10.3892/ijmm.2015.2076

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

- 18) Dávalos A, Goedeke L, Smibert P, Ramírez CM, Warriar NP, Andreo U, Cirera-Salinas D, Rayner K, Suresh U, Pastor-Pareja JC, Esplugues E, Fisher EA, Penalva LO, Moore KJ, Suárez Y, Lai EC, Fernández-Hernando C. miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 May 31;108(22):9232-7. doi: 10.1073/pnas.1102281108
- 19) Sharma N, Verma R, Kumawat KL, Basu A, Singh SK. miR-146a suppresses cellular immune response during Japanese encephalitis virus JaOArS982 strain infection in human microglial cells. *J Neuroinflammation*. 2015 Dec;12(1):249. doi: 10.1186/s12974-015-0249-0
- 20) Dubinsky AN, Dastidar SG, Hsu CL, Zahra R, Djakovic SN, Duarte S, Esau CC, Spencer B, Ashe TD, Fischer KM, MacKenna DA, Sopher BL, Masliah E, Gaasterland T, Chau BN, Pereira de Almeida L, Morrison BE, La Spada AR. Let-7 coordinately suppresses components of the amino acid sensing pathway to repress mTORC1 and induce autophagy. *Cell Metab*. 2014 Oct 7;20(4):626-38. doi: 10.1016/j.cmet.2014.09.001
- 21) Samantarrai D, Dash S, Chhetri B, Mallick B. Genomic and epigenomic cross-talks in the regulatory landscape of miRNAs in breast cancer. *Mol Cancer Res*. 2013 Apr;11(4):315-28. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0649
- 22) Drakaki A, Hatziapostolou M, Iliopoulos D. Therapeutically targeting microRNAs in liver cancer. *Curr Pharm Des*. 2013;19(7):1180-91
- 23) Omar Faruq and Andrea Vecchione. microRNA: diagnostic perspective. *Front Med (Lausanne)*. 2015 Aug 3;2:51. doi: 10.3389/fmed.2015.00051. eCollection 2015
- 24) Colin C. Pritchard, Heather H. Cheng & Muneesh Tewar. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nature Reviews Genetics* 13, 358-369 (May 2012) | doi:10.1038/nrg3198
- 25) Yang GD, Yan K, Wu BJ, Wang YH, Gao YX, Zheng CC. Genomewide analysis of intronic microRNAs in rice and Arabidopsis. *Journal of Genetics*, Vol. 91, No. 3, December 2012

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

- 26) Geetanjali Chawla and Nicholas S. Sokol. ADAR mediates differential expression of polycistronic microRNAs. *Nucleic Acids Research*, 2014, Vol. 42, No. 8 5245–5255
- 27) Liu Z, Wang J, Li G, Wang HW. Structure of precursor microRNA's terminal loop regulates human Dicer's dicing activity by switching DEXH/D domain. *Protein Cell* 2015, 6(3):185–193 DOI 10.1007/s13238-014-0124-2
- 28) Yue J. miRNA and vascular cell movement. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011 Jul 18;63(8):616-22. doi: 10.1016/j.addr.2011.01.001
- 29) Mao B, Wang G. MicroRNAs involved with hepatocellular carcinoma (Review). *Oncol Rep.* Pages: 2811-2820. 2015 Sep 15
- 30) Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC. The Mirtron Pathway Generates microRNA-Class Regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell.* 2007 Jul 13; 130(1): 89–100
- 31) Blahna MT, Hata A. Smad-mediated regulation of microRNA biosynthesis. *FEBS Letters* Volume 586, Issue 14, 4 July 2012, Pages 1906–1912
- 32) Beezhold KJ, Castranova V, Chen F. Microprocessor of microRNAs: regulation and potential for therapeutic intervention. *Molecular Cancer* 2010, 9:134. doi: 10.1186/1476-4598-9-134
- 33) Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes & development* 20:515–524 © 2006 by Cold Spring Harbor Laboratory Press ISSN 0890-9369/06
- 34) Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. Getting to the Root of miRNA-Mediated Gene Silencing. *Cell.* 2008 Jan 11;132(1):9-14. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.024
- 35) Ma H, Wu Y, Choi JG, Wu H. Lower and upper stem–single-stranded RNA junctions together determine the Drosha cleavage site. *PNAS* December 17, 2013 vol. 110 no. 51 20687–206929
- 36) Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, Sohn SY, Cho Y, Zhang BT, Kim VN. Molecular Basis for the Recognition of Primary microRNAs by

- the Drosha-DGCR8 Complex. *Cell* Volume 125, Issue 5, 2 June 2006, Pages 887–901. doi:10.1016/j.cell.2006.03.043
- 37) Wostenberg C, Quarles KA, Showalter SA. Dynamic origins of differential RNA binding function in two dsRBDs from the miRNA "microprocessor" complex. *Biochemistry*. 2010 Dec 21;49(50):10728-36. doi: 10.1021/bi1015716
- 38) Seitz H, Zamore PD. Rethinking the Microprocessor. *Cell* Volume 125, Issue 5, 2 June 2006, Pages 827–829. doi:10.1016/j.cell.2006.05.018
- 39) Sohn SY, Bae WJ, Kim JJ, Yeom KH, Kim VN, Cho Y. Crystal structure of human DGCR8 core. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2007 Sep;14(9):847-53
- 40) Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*. 2004 Feb;10(2):185-91. doi: 10.1261/rna.5167604
- 41) Salvadè G. *Quaderni di Anatomia Citologia*. MEG Edizioni 2011 pag.20
- 42) Takeiwa T, Taniguchi I, Ohno M. Exportin-5 mediates nuclear export of SRP RNA in vertebrates. *Genes Cells*. 2015 Feb 4. doi: 10.1111/gtc.12218
- 43) Foulkes WD, Priest JR, Duchaine TF. DICER1: mutations, microRNAs and mechanisms. *Nature Reviews Cancer* 14, 662–672 (2014) doi:10.1038/nrc3802
- 44) Taylor DW, Ma E, Shigematsu H, Cianfrocco MA, Noland CL, Nagayama K, Nogales E, Doudna JA, Wang HW. Substrate-specific structural rearrangements of human Dicer. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2013 Jun;20(6):662-70. doi: 10.1038/nsmb.2564
- 45) Erler P, Keutgen XM, Crowley MJ, Zetoune T, Kundel A, Kleiman D, Beninato T, Scognamiglio T, Elemento O, Zarnegar R, Fahey TJ 3rd. Dicer expression and microRNA dysregulation associate with aggressive features in thyroid cancer. *Surgery*. 2014 Dec;156(6):1342-50; discussion 1350. doi: 10.1016/j.surg.2014.08.007

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

- 46) ZhenLong Ye, HuaJun Jin, QiJun Qian. Argonaute 2: A Novel Rising Star in Cancer Research. *Journal of Cancer* 2015; 6(9): 877-882
- 47) Ruiz MA, Chakrabarti S. MicroRNAs: the underlying mediators of pathogenetic processes in vascular complications of diabetes. *Can J Diabetes*. 2013 Oct;37(5):339-44. doi: 10.1016/j.jcjd.2013.07.003
- 48) Femminella GD, Ferrara N, Rengo G. The emerging role of microRNAs in Alzheimer's disease. *Front Physiol*. 2015 Feb 12;6:40. doi: 10.3389/fphys.2015.00040. eCollection 2015
- 49) Gyongyi Szabo and Shashi Bala. MicroRNAs in liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013 September ; 10(9): 542–552
- 50) García-Rodríguez JL, Barbier-Torres L, Fernández-Álvarez S, Gutiérrez-de Juan V, Monte MJ, Halilbasic E, Herranz D, Álvarez L, Aspichueta P, Marín JJ, Trauner M, Mato JM, Serrano M, Beraza N, Martínez-Chantar ML. SIRT1 controls liver regeneration by regulating bile acid metabolism through farnesoid X receptor and mammalian target of rapamycin signaling. *Hepatology*. 2014 May;59(5):1972-83. doi: 10.1002/hep.26971
- 51) Schlageter M, Terracciano LM, D'Angelo S, Sorrentino P. Histopathology of Hepatocellular Carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2014 Nov 21;20(43):15955-64. doi: 10.3748/wjg.v20.i43.15955
- 52) Buendia MA, Neuveut C. Hepatocellular Carcinoma. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015 Feb 2;5(2):a021444. doi: 10.1101/cshperspect.a021444
- 53) Hamid AS, Tesfamariam IG, Zhang Y, Zhang ZG. Aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinoma in developing countries: Geographical distribution, mechanism of action and prevention. *Oncol Lett*. 2013 Apr;5(4):1087-1092. Epub 2013 Jan 31. doi: 10.3892/ol.2013.1169
- 54) Blonski W, Kotlyar DS, Forde KA. Non-viral causes of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2010 Aug 7; 16(29): 3603–3615. doi: 10.3748/wjg.v16.i29.3603

- 55) Bosetti C, Turati F, La Vecchia C. Hepatocellular carcinoma epidemiology. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2014 Oct;28(5):753-70. doi: 10.1016/j.bpg.2014.08.007
- 56) Hashem B. El-Serag. Epidemiology of Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2012 May; 142(6): 1264–1273.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2011.12.061
- 57) Matsuda Y, Wakai T, Kubota M, Osawa M, Sanpei A, Fujimaki S. Mycotoxins are conventional and novel risk biomarkers for hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2013 May 7; 19(17): 2587–2590. doi: 10.3748/wjg.v19.i17.2587
- 58) Larsson SC, Wolk A. Coffee Consumption and Risk of Liver Cancer: A Meta-Analysis. *Gastroenterology* May 2007 Volume 132, Issue 5, Pages 1740–1745
- 59) Somasundaram Subramaniam, Robin K. Kelley, Alan P. Venook A review of hepatocellular carcinoma (HCC) staging systems. *Chinese Clinical Oncology*. Vol 2, No 4 (December 2013) doi: 10.3978/j.issn.2304-3865.2013.07.05
- 60) Yang N, Ekanem NR, Sakyi CA, Ray SD. Hepatocellular carcinoma and microRNA: New perspectives on therapeutics and diagnostics. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2015 Jan;81:62-74. doi: 10.1016/j.addr.2014.10.029
- 61) C Braconi, T Kogure, N Valeri, N Huang, G Nuovo, S Costinean, M Negrini, E Miotto, CM Croce, and T Patel. microRNA-29 can regulate expression of the long non-coding RNA gene *MEG3* in hepatocellular cancer. *Oncogene*. 2011 Nov 24; 30(47): 4750–4756 doi: 10.1038/onc.2011.193
- 62) Xian-Ming Chen. MicroRNA signatures in liver diseases. *World J Gastroenterol* 2009 April 14; 15(14): 1665-1672
- 63) Mizuguchi Y, Takizawa T, Yoshida H, Uchida E. Dysregulated microRNAs in progression of hepatocellular carcinoma: A systematic review. *Hepatol Res*. 2015
- 64) Ladeiro Y, Couchy G, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Pelletier L, Rebouissou S, Zucman-Rossi J. MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

- with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations. *Hepatology*. 2008 Jun;47(6):1955-63
- 65) Cinzia Puppin, Cosimo Durante, Marialuisa Sponziello, Antonella Verrienti, Valeria Pecce, Elisa Lavarone, Federica Baldan, Antonio Francesco Campese, Amelie Boichard, Ludovic Lacroix, Diego Russo, Sebastiano Filetti, Giuseppe Damante. Overexpression of genes involved in miRNA biogenesis in medullary thyroid carcinomas with RET mutation. *Endocrine* (2014) 47:528–536
- 66) B Muralidhar, LD Goldstein, G Ng, DM Winder, RD Palmer, EL Gooding, NL Barbosa-Morais, G Mukherjee, NP Thorne, I Roberts, MR Pett and N Coleman. Global microRNA profiles in cervical squamous cell carcinoma depend on Drosha expression levels. *Journal of Pathology J Pathol* 2007; 212: 368–377
- 67) Zhang Z, Zhang G, Kong C, Bi J, Gong D, Yu X, Shi D, Zhan B, Ye P. EIF2C, Dicer, and Drosha are up-regulated along tumor progression and associated with poor prognosis in bladder carcinoma. *Tumour Biol*. 2015 Jul;36(7):5071-9
- 68) Vaksman O, Hetland TE, Trope' CG, Reich R, Davidson B. Argonaute, Dicer, and Drosha are up-regulated along tumor progression in serous ovarian carcinoma. *Hum Pathol*. 2012;43(11):2062–9
- 69) Mori M, Triboulet R, Mohseni M, Schlegelmilch K, Shrestha K, Camargo FD, Gregory RI. Hippo signaling regulates microprocessor and links cell-density-dependent miRNA biogenesis to cancer. *Cell*. 2014 Feb 27;156(5):893-906
- 70) Chiosea S, Jelezcova E, Chandran U, Luo J, Mantha G, Sobol RW, Dacic S. Overexpression of Dicer in precursor lesions of lung adenocarcinoma. *Cancer Res*. 2007 Mar 1;67(5):2345-50
- 71) YING BAI, GUANG-RONG QIU, FAN ZHOU, LI-YING GONG, FENG GAO and KAI-LAI SUN. Overexpression of *DICER1* induced by the upregulation of GATA1 contributes to the proliferation and apoptosis of

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari

leukemia cells. INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY 42: 1317-1324, 2013

72) C. Faber, D. Horst a, F. Hlubek, T. Kirchner. Overexpression of Dicer predicts poor survival in colorectal cancer. EUROPEAN JOURNAL OF CANCER 47 (2011) 1414-1419

73) Kitagawa N, Ojima H, Shirakihara T, Shimizu H, Kokubu A, Urushidate T, Totoki Y, Kosuge T, Miyagawa S, Shibata T Downregulation of the microRNA biogenesis components and its association with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. Cancer Sci. 2013 May;104(5):543-51

Dott.ssa Elisa Barattini

Maturazione dei microRNA: effetto sulla regolazione dell'espressione genica nell'epatocarcinogenesi umana

Tesi di dottorato in Scienze Biomediche con indirizzo in Epidemiologia molecolare dei tumori.

Università degli studi di Sassari