

UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"



**DOTTORATO DI RICERCA
IN
BIOLOGIA AVANZATA**

XXI CICLO

**Un nuovo circuito di regolazione del fattore
trascrizionale AP-1 e di un onco-microRNA nella
trasformazione neoplastica.**

Coordinatore
Prof.ssa Laura Fucci

Dottorando
Francesco Talotta

Tutor
Prof. Pasquale Delli Bovi

Correlatore
Dott. Pasquale Verde

ANNO ACCADEMICO 2008

INDICE

INTRODUZIONE	pag.4
La tiroide e le sue neoplasie.	pag.5
Il fattore trascrizionale AP-1.	pag.6
La trasduzione del segnale e le risposte biologiche attivate da Ras.	pag.7
AP-1 e la trasformazione neoplastica.	pag.11
I microRNA e la tumorigenesi.	pag.17
RISULTATI	pag.20
Cambiamento della composizione del complesso AP-1 in seguito all'induzione dell'oncoproteina Ras.	pag.22
Inibizione stabile dell'attività di AP-1 mediante un mutante della proteina c-Fos ad attività dominante negativa.	pag.23
AP-1 media l'induzione di miR-21 in risposta all'oncoproteina Ras.	pag.25
Fra-1 è reclutato assieme a c-Jun e JunB su una regione conservata fiancheggiante il 5' di miR-21.	pag.27
Identificazione dei siti AP-1 del promotore di miR-21 sensibili all'attivazione di Ras.	pag.29
PDCD4 e PTEN sono regolati negativamente in risposta a Ras attraverso un meccanismo dipendente da AP-1 e miR-21.	pag.31
La repressione di PDCD4 mediata da miR-21 è necessaria per la piena induzione dell'attività di AP-1 in risposta a Ras.	pag.33
MiR-21 controlla positivamente la vitalità delle cellule di tiroide in risposta all'oncoproteina Ras.	pag.35
DISCUSSIONE	pag.37

MATERIALI E METODI	pag.42
Colture cellulari e trasfezioni.	pag.43
Vettori e saggi <i>reporter</i> .	pag.43
Estratti proteici totali e nucleari.	pag.44
Western blotting.	pag.45
Northern blotting.	pag.45
Primer extension.	pag.46
Saggio dell'espressione di microRNA mediante qPCR.	pag.46
EMSA.	pag.47
Immuno-precipitazione della cromatina (ChIP).	pag.47
PCR.	pag.48
Primers.	pag.48
BIBLIOGRAFIA	pag.51

Introduzione.

La tiroide e le sue neoplasie.

La ghiandola tiroidea è composta da due tipi cellulari che producono due distinti tipi d'ormoni: le cellule follicolari e le cellule parafollicolari o cellule C. Le cellule follicolari comprendono la maggior parte dell'epitelio e sono responsabili della sintesi degli ormoni tiroidei. Le cellule C sono intrafollicolari e parafollicolari e producono la calcitonina.

Il cancro della tiroide è il tumore più comune degli organi endocrini, e la sua incidenza nella popolazione varia da 0,5 a 10 casi su 100.000, ed è in netto aumento negli ultimi anni. Oltre il 95% dei carcinomi tiroidei derivano dalle cellule follicolari, mentre una minima parte (circa il 3%) si origina dalle cellule C. Sulla base di parametri istologici e clinici, i carcinomi che derivano dalle cellule follicolari sono generalmente suddivisi in: ben differenziati, poco differenziati e indifferenziati. I carcinomi ben differenziati comprendono i carcinomi papilliferi (PTC) e una parte dei carcinomi follicolari (FTC). Entrambi mantengono il fenotipo di cellule follicolari, e sono capaci di immagazzinare lo iodio, di rispondere all'ormone tirootropo (TSH) e di produrre tireoglobulina. I tumori ben differenziati hanno in gran parte dei casi una buona prognosi, dal momento che possono essere trattati mediante iodio radioattivo, tiroxina o tiroidectomia. Al contrario, il carcinoma indifferenziato o anaplastico (ATC) non mostra alcuna caratteristica del fenotipo differenziato, ed è un tumore altamente aggressivo e letale. I carcinomi poco differenziati hanno un fenotipo e uno sviluppo intermedio tra il carcinoma ben differenziato e il carcinoma indifferenziato (Kondo et al., 2006).

Nel carcinoma ben differenziato, che è il più comune tumore della tiroide, mutazioni a carico di geni che agiscono attraverso il *pathway* delle MAP chinasi (*Mitogen-Activated Protein*) sono implicate nella tumorigenesi. In circa il 70% dei casi, si trovano principalmente riarrangiamenti cromosomici a carico del gene *ret* (RET/PTC), mutazioni a carico degli oncogeni *ras* e la mutazione V600E dell'oncoproteina BRAF. Le forme attivate di Ras sono implicate in diversi tumori umani, con un'incidenza del 20-30%, a cui contribuisce l'elevata frequenza di alterazioni nel gene *Ki-ras* negli adenocarcinomi del colon (50%) e del pancreas (90%). L'attivazione oncogenica del *signalling* delle MAP chinasi

promuove un aumento dell'instabilità genomica che porta a successive alterazioni genetiche, coinvolgendo altri segnali di trasduzione, regolatori del ciclo cellulare e diverse molecole coinvolte nell'adesione cellulare. L'interazione tra l'instabilità genomica e le successive alterazioni genetiche, favorisce la progressione del carcinoma da ben differenziato a indifferenziato, e nella maggior parte dei casi tale progressione è accompagnata da mutazioni che sopprimono l'attività o l'espressione del fattore trascrizionale p53 (Fagin, 2004; Riesco-Eizaguirre & Santisteban, 2007).

L'attivazione oncogenica del *pathway* delle MAP chinasi, mediata da diversi fattori trascrizionali, porta alla deregolazione dell'espressione di geni coinvolti negli “ *hallmarks of cancer*” che identificano le sei caratteristiche distintive della malignità tumorale: potenziale replicativo illimitato, insensibilità ai fattori che limitano la crescita, auto-sufficienza dei segnali di crescita, evasione dell'apoptosi, crescita invasiva e metastasi, angiogenesi (Hanahan & Weinberg, 2000).

Il fattore trascrizionale AP-1.

La risposta integrata all'attivazione della via di trasduzione delle MAP chinasi vede il fattore trascrizionale AP-1 (Activator Protein 1) tra gli effettori nucleari fondamentali. Numerosi geni coinvolti nel fenotipo neoplastico contengono elementi regolativi in grado di legare AP-1. Tali elementi sono caratterizzate dalla sequenza *consensus* 5'-TGAC/GTCA-3', denominata TRE (*TPA-Responsive Element*), in quanto originariamente implicata nella risposta trascrizionale ai promotori tumorali come il TPA (*12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*). Il TRE, presente nei promotori ed *enhancers* di numerosi geni, è stato inizialmente caratterizzato per la sua funzione regolativa di vari geni coinvolti nella degradazione della matrice extracellulare (*MMPs*, *uPA*, *uPAR*), nella regolazione dell'angiogenesi (*VEGF*) (Angel et al., 1987a; Angel et al., 1987b; Eferl & Wagner, 2003).

AP-1 è un complesso dimerico che comprende principalmente i prodotti della famiglia del proto-oncogene *c-jun*, di cui fanno parte anche *junD* e *junB*, e quelli della famiglia *c-fos*, a cui appartengono, oltre *c-fos*, *fosB*, *fra1* e *fra2*, oltre ad alcune proteine della famiglia ATF. I membri di tali famiglie sono caratterizzati da una regione b-ZIP costituita da un dominio basico, responsabile del legame al DNA, adiacente ad un dominio a cerniera di leucine, responsabile della dimerizzazione e della stabilizzazione del complesso sul DNA. La cerniera di leucine è caratterizzata dalla ripetizione di cinque residui di leucina spazati da intervalli di sette aminoacidi, strutturati secondo un dominio ad α -elica (Kouzarides & Ziff, 1988; Landschulz et al., 1988; Sassone-Corsi et al., 1988). Tale struttura è coinvolta in interazioni eterotipiche nel caso delle proteine Fos, e sia etero- che omotipiche per le proteine Jun, rendendo molto ampia la diversità combinatoria del complesso AP-1. Nonostante simili specificità di sequenza, i complessi omo ed eterodimerici (Jun/Jun e Jun/Fos) hanno una differente affinità di legame al DNA (Ryseck & Bravo, 1991). Infatti, eterodimeri c-Jun/c-Fos possiedono un'affinità per il DNA e un potenziale di transattivazione maggiore di un qualsiasi omodimero Jun/Jun. Studi di mutagenesi sulla proteina c-Fos hanno dimostrato che l'aumento dell'affinità di legame al DNA del dimero Jun/Fos, rispetto al dimero Jun/Jun, è diretta conseguenza della maggiore forza

d'interazione che si realizza tra le cerniere di leucine delle due proteine (Kouzarides & Ziff, 1988; Nakabeppu et al., 1988; Rauscher et al., 1988).

La trasduzione del segnale e le risposte biologiche attivate da Ras.

Nei mammiferi, *ras* comprende una famiglia di tre proto-oncogeni (*Ha-ras*, *Ki-ras* e *N-ras*), che sono ubiquitariamente espressi e codificano per proteine appartenenti alla famiglia delle piccole GTPasi (Yamamoto et al., 1999).

Le proteine Ras sono dotate di attività GTPasica e si associano alla faccia interna della membrana plasmatica grazie alla palmitoilazione e alla farnesilazione dell'estremità carbossi-terminale. La loro funzionalità dipende dalla capacità di ciclare tra due conformazioni: una attiva e legata al GTP, ed una inattiva e legata al GDP. La conversione da una forma inattiva ad una attiva è mediata da fattori di scambio del nucleotide guanina (GEFs: Guanine Exchange Factors), che aumentano la velocità di dissociazione del GDP dalla proteina Ras e consentono il legame del GTP. La molecola viene quindi riportata in uno stato inattivo attraverso l'attività GTPasica stimolata dalle Proteine Attrivatrici delle GTPasi Ras (GAPs). L'attività GTPasica di Ras è alla base del suo effetto biologico. Infatti, mutazioni presenti nelle forme oncogeniche, fanno perdere alla molecola la capacità di idrolizzare GTP, bloccandola in uno stato costitutivamente attivo.

Le proteine Ras funzionano come “interruttori molecolari” essendo componenti essenziali di *pathway* di segnali che regolano la proliferazione, la morfogenesi e il differenziamento a monte di recettori provvisti di attività chinasi intrinseca (RTK: Receptor Tyrosin Kinase).

Una volta attivato, Ras è in grado di reclutare e attivare gli effettori situati a valle attraverso un sistema a cascata. Tra i vari effettori di Ras, le proteine Raf (Raf1, B-Raf e A-Raf) sono quelle meglio caratterizzate. Le Raf sono una famiglia di serina-treonina chinasi, la cui attivazione prevede il loro reclutamento sulla membrana e un cambiamento conformazionale indotti da Ras. L'attività di Raf porta all'attivazione delle chinasi attivate da stimoli mitogeni (MAPK) di tipo ERK (Extracellular Regulated Kinase). Le chinasi appartenenti a questa via sono

classificabili secondo una precisa gerarchia a costituire un “ modulo di attivazione sequenziale”, altamente conservato dal lievito all’uomo. L’attivazione delle MAP chinasi, delle quali fanno parte oltre le ERK anche le JNK (c-Jun-N-terminal Kinase) e p38 chinasi, avviene mediante la fosforilazione in residui di treonina e tirosina da parte delle MAPK chinasi (MAPKK), per questo definite come chinasi a doppia specificità. Le MAPKK a loro volta sono substrato di MAPKK chinasi (MAPKKK), serina-treonina chinasi attivate da altre chinasi o dall’interazione con piccole GTPasi.

La via di ERK è tra le meglio caratterizzate: Ras attiva le chinasi più a monte le MAPKKK della famiglia Raf, il cui substrato è rappresentato dalle MAPKK (MEK1/2). Immediatamente a valle si collocano le ERK1/2, che oltre a fosforilare diversi componenti citoplasmatici, traslocano nel nucleo e fosforilano numerosi fattori trascrizionali, fra i quali Elk1, Ets1, c-Myc e alcuni componenti di AP-1. L’attivazione delle ERK avviene in risposta a molti stimoli extracellulari che inducono la proliferazione, il differenziamento, la sopravvivenza cellulare ecc. Per determinare un completo effetto biologico di Ras, sia nella trasduzione di un segnale che nella trasformazione oncogenica, l’attivazione della sola via Raf/ERK non è sufficiente, ma è necessaria l’attivazione contemporanea di diversi effettori e l’integrazione delle vie di trasduzione da questi innescate. Tra queste vie di trasduzione, il pathway PI3K/Akt è spesso indispensabile per l’effetto trasformante di Ras.

La fosfatidil-inositolo-3 chinasi (PI3K) è un enzima eterodimerico costituito da una subunità regolativa e una catalitica, contenente un sito di interazione diretta con Ras. PI3K è in grado di fosforilare in posizione 3 il fosfatidilinositolo (PI), un costituente fosfolipidico della membrana, generando molecole che agiscono come secondi messaggeri. PI3K induce l’attivazione della via PKB/Akt, i cui bersagli di fosforilazione sono proteine coinvolte nell’apoptosi e fattori trascrizionali. PI3K media in genere segnali di sopravvivenza che possono essere attivati in risposta a stimoli extracellulari oppure innescati in maniera autonoma, per esempio in seguito alla trasformazione. Nelle cellule trasformate da Ras, PI3K media, per esempio, la protezione dall’apoptosi indotta dal distacco dalla matrice extracellulare (anoikis). La famiglia delle PI3K è attivata in risposta ad un’ampia varietà di stimoli extracellulari, anche indipendenti da Ras, sebbene tutte le PI3K contengano siti di interazione con Ras. La produzione del fosfoinositolo da parte

di PI3K è principalmente contrastata dall'azione di specifiche fosfatasi, che catalizzano l'idrolisi del fosfato in posizione 3 del fosfatidilinositolo . Tra le diverse fosfatasi, PTEN, che inibisce l'attività delle PI3K di tipo I e II, svolge un ruolo importante nella trasformazione neoplastica. Infatti, l'espressione del gene codificante PTEN è inibita da mutazioni o silenziamento epigenetico in diversi tipi di tumori, e in alcuni casi la ridotta espressione di PTEN correla con l'aumento di fosfatidilinositolo nelle cellule tumorali (in "Molecular mechanisms of signal transduction" , edito da J.L. Bos, IOS press, NATO Science Series).

Pertanto, è evidente come PI3K costituisca un elemento centrale non solo per l'attività di Ras, ma anche per l'integrazione di questo con differenti segnali extracellulari.

AP-1 e la trasformazione neoplastica.

Il ruolo del fattore trascrizionale AP-1 come bersaglio della trasformazione neoplastica è ben consolidato attraverso un ampio numero di studi sia *in vitro* che *in vivo*. I diversi componenti del fattore trascrizionale AP-1 sono variamente implicati nei diversi processi che portano alla tumorigenesi. Una prima evidenza a favore del ruolo oncogénico deriva dalla scoperta delle oncoproteine virali v-Fos e v-Jun, rispettivamente, nel virus dell' osteosarcoma di Finkel-Biskis-Jinkins (FBJ-MuSV) e nel virus 17 del sarcoma aviario (infatti jun deriva dal giapponese " junana" che significa 17). L'identificazione dei loro omologhi cellulari, c-Jun e c-Fos, come componenti di AP-1, ha immediatamente messo in relazione il fattore trascrizionale con il controllo della crescita cellulare e la neoplasia (Angel et al., 1988; Bohmann et al., 1987; Finkel et al., 1966; Maki et al., 1987; Vogt, 2001). Questa associazione è stata rinforzata dall'osservazione che l'attività di AP-1 è stimolata dal trattamento con il promotore tumorale TPA e con i fattori di crescita (Miller et al., 1984). Per quanto concerne le proteine Jun, è stato visto che l'iperespressione in fibroblasti dell'oncoproteina virale (v-Jun), caratterizzata da una serie di mutazioni tra le quali la delezione del dominio N-terminale coinvolto nella degradazione e nel reclutamento delle JNK1/2, porta alla formazione di fibrosarcomi (Schuh et al., 1990). Originariamente è stata osservata che la co-espressione di *c-jun* con la forma attivata di diversi oncogéni, quali *ras* o *src*, causa la trasformazione di diversi tipi cellulari (Schutte et al., 1989).

Un'ulteriore evidenza del coinvolgimento di *c-jun* nella trasformazione, deriva dallo studio di culture di fibroblasti NIH-3T3 trasformate da diverse oncoproteine, quali Ras e Src. E' stato osservato che l'espressione della proteina mutata ad attività dominante negativa di c-Jun, genera cellule revertenti che hanno ristabilito la crescita dipende dalla densità e la capacità di adedire al substrato. La conferma definitiva del ruolo di c-Jun nella trasformazione *in vitro* da parte dell'onco-proteina Ras, viene dall'analisi di colture di fibroblasti ottenute da embrioni di topi omozigoti per la delezione di *c-jun* (*c-jun*^{-/-}). In queste cellule la trasformazione indotta da *ras* è gravemente compromessa, e le caratteristiche tipiche della trasformazione, quali la perdita dell'inibizione da contatto, l'indipendenza dall'ancoraggio e la tumorigenicità vengono recuperate solo dalla

ri-espressione di *c-jun* (Johnson et al., 1996). *In vivo*, è stato osservato che la riduzione dell'attività di c-Jun nei cheratinociti, mediante l'uso del transgene ad attività dominante negativa (K-14-TAM67), interferisce con lo sviluppo del papilloma. (Eferl et al., 2003b; Eferl & Wagner, 2003; Young et al., 1999).

Studi sullo sviluppo del tumore del fegato, hanno evidenziato che c-jun si trova iperespresso nell'epatocarcinoma umano e nel tumore del fegato di topo indotto chimicamente. L'uso del knockout condizionale di c-Jun ha consentito di studiare il suo ruolo nei differenti stadi dello sviluppo del tumore indotto chimicamente. In particolare, è stato visto che c-Jun è richiesto nei primi stadi dello sviluppo tumorale, e che la sua inattivazione dopo la formazione del tumore causa una drastica diminuzione del numero e della grandezza dei tumori. La diminuzione dei tumori è causata da un aumento di apoptosi, dovuto ad un aumento di p53 e del suo gene proapoptotico *noxa* nelle cellule c-Jun^{-/-} (Eferl et al., 2003a).

Contrariamente a c-Jun, sia JunB che JunD mancano di attività trasformante. Anzi, le proteine JunB e JunD possono avere effetti anti-oncogenici. L'attività anti-oncogenica di JunB è stata confermata da studi *in vivo* usando topi *knockout* di *junB* (*junB*^{-/-}), in cui la mancanza viene recuperata dal transgene *junB*. Il transgene recupera la letalità embrionale dei feti *junB*^{-/-} ma, nella progenie si osserva un'elevata frequenza di leucemia mieloide progressiva, con un aumento della proliferazione delle cellule progenitrici dei granulociti (Passegue et al., 2001). È stato osservato che le cellule della linea mieloide sono caratterizzati dalla mancanza d'espressione di *junB*, a sua volta conseguenza del silenziamento epigenetico del transgene, e da un'apoptosi ridotta, che correla con l'aumento d'espressione di due geni anti-apoptotici, BCL-2 e BCL-XL. L'attività anti-oncogenica di JunB è stata confermata da recenti studi, attraverso i quali è stato dimostrato che l'inattivazione condizionale di *junB* nell'epidermide di topi *junB*^{+/-} promuove la formazione di papillomi spontanei. Ciò indica che JunB ha un'attività di soppressore tumorale in diversi tessuti (Eferl & Wagner, 2003). A differenza di JunB, l'attività anti-oncogenica di JunD è meno definita. Alcuni studi su fibroblasti in coltura hanno dimostrato che JunD è un regolatore negativo della proliferazione cellulare ed un parziale antagonista della trasformazione indotta da *ras* (Pfarr et al., 1994).

Per quanto riguarda i membri della famiglia Fos il componente meglio caratterizzato è c-Fos. Analogamente alla sua controparte virale, l'iperespressione di c-Fos nei topi, causa la formazione di osteosarcomi mediante la trasformazione

di condroblasti ed osteoclasti, identificando questi due tipi cellulari come bersagli della tumorigenesi indotta da c-Fos. In tali cellule è stato osservato che si accumulano alti livelli di ciclina D1, suggerendo che l'espressione dei regolatori del ciclo cellulare possono contribuire alla trasformazione indotta da c-Fos *in vivo* (Grigoriadis et al., 1993; Jochum et al., 2001; Sunter et al., 1998). Inoltre, l'iperespressione di c-Fos induce migrazione in linee cellulari di carcinoma mammario non invasivo (CSLM0 cells), e causa l'induzione di geni *target* di AP-1 coinvolti nell'invasione e nella metastasi, come uPA, PAI-1, uPAR, HMGA(Y). L'espressione di c-Fos induce anche osteopontina, trombospondina e CD44 che si trovano generalmente iperespressi nelle metastasi di tumori mammari umani (Andersen et al., 2002). E' stato osservato anche, che c-Fos media la trasformazione indotta da Ras, contribuendo allo sviluppo di tumori dell'epidermide. Infatti, topi esprimenti il transgene v-Ha-ras, ma privi di *c-fos* (*c-fos*^{-/-}), sono incapaci di sviluppare il tumore (Saez et al., 1995). Sorprendentemente, altri studi hanno evidenziato un ruolo anti-oncogénico di c-Fos. Topi doppi *knockout* per i geni *c-fos* e *p53* (*c-fos*^{-/-} e *p53*^{-/-}) sviluppano, con alta penetranza, sarcomi dei raddomioblasti, detti raddomiosarcomi, mentre topi privi del solo *p53* li sviluppano raramente (Fleischmann et al., 2003). Un altro ben caratterizzato componente della famiglia FOS è Fra-1. E' stato visto che l'iperespressione di Fra-1 in fibroblasti non porta ad un'evidente trasformazione morfologica o formazione di *foci*, ma è stata riscontrata una crescita indipendente dall'ancoraggio *in vitro* e la formazione di tumori in topi nudi (Bergers et al., 1995). In fibroblasti trasformati da *ras*, Fra-1 è il componente predominante del complesso AP-1 (Mechta et al., 1997), ed è iperespresso in diversi tumori solidi umani. Fra-1 svolge un ruolo importante nel controllo della motilità e dell'invasione cellulare di cellule tumorali. E' stato osservato che l'espressione di Fra-1 correla fortemente con il fenotipo mesenchimale delle varianti aggressive carcinoma mammario umano e adenocarcinoma della mammella di topo (Belguise et al., 2005). L'espressione ectopica di Fra-1 in cellule di adenocarcinoma mammario non invasivo (CSML0) è sufficiente ad indurre trasformazione morfologica, motilità e invasione cellulare (Andersen et al., 2002). Analogamente a c-Fos, Fra-1 induce l'espressione di diversi componenti dell'attivazione del plasminogeno (uPA, uPAR, PAI-1), e del sistema delle metalloproteasi di matrice (MMP-9, MMP-1, TIMP-1), fortemente implicati nelle metastasi tumorali

(Deryugina & Quigley, 2006; Sidenius & Blasi, 2003). Per quanto riguarda un altro componente della famiglia FOS, FosB, è stato visto che la sua iperespressione è in grado di trasformare fibroblasti in coltura, ma non è capace di sviluppare tumori in topi transgenici (Kovary et al., 1991). Analogamente a c-Fos e Fra-1, anche FosB, quando viene transientemente iperespresso, è in grado di indurre migrazione di linee cellulari non invasive di carcinoma mammario (MCF7) (Belguise et al., 2005). Invece, Fra-2 ha attività trasformante in fibroblasti embrionali di pollo, ma non in fibroblasti di ratto (Foletta et al., 1994).

Gli studi del ruolo di AP-1 nella trasformazione neoplastica derivano, non solo dall'uso di *knockout* per i singoli componenti, ma anche utilizzando una proteina ad attività dominante negativa, A-FOS. Tale proteina deriva da c-Fos, in cui la regione N-terminale della cerniera di leucine è stata rimpiazzata da una sequenza peptidica anfipatica. L'estensione acida della sequenza peptidica e la regione basica delle proteine JUN formano una struttura eterodimerica *coil-coiled*, che stabilizza il complesso e impedisce il legame della regione basica di JUN al DNA. La prima evidenza *in vivo* dell'interferenza di A-FOS con l'attività biologica di AP-1, è stata fatta in fibroblasti di topo, in cui la co-espressione di A-FOS con H-Ras inibisce la formazione di foci trasformanti (Olive et al., 1997).

Successivamente, l'inibizione del fenotipo trasformato da parte di A-FOS, è stata caratterizzata in vari sistemi cellulari. L'elevata motilità della linea cellulare L929 di adenocarcinoma della mammella correla con gli elevati livelli di espressione di Fra-1 e Fra-2. In questo sistema l'espressione del dominante negativo A-FOS, riduce drammaticamente la migrazione cellulare, e causa la perdita della morfologia fibroblastoide (Tkach et al., 2003).

L'elevata aggressività e invasività delle cellule di fibrosarcoma umano HT1080, è dovuta principalmente a mutazioni oncogeniche a carico di Ras che, attraverso l'attivazione delle ERK, JNK e PI3K, provoca una forte attività di AP-1. L'espressione di A-FOS riduce drasticamente la migrazione cellulare e causa un arresto del ciclo cellulare in fase G1. Inoltre, l'analisi di espressione mediante *microarray*, ha evidenziato che A-FOS interferisce con l'espressione di geni coinvolti nella migrazione cellulare, come MMP-9 e uPAR, e geni coinvolti nella regolazione del citoscheletro, come CapG e la subunità p41 del complesso ARP2/3 (Bahassi et al., 2004). Studi *in vivo* della carcinogenesi della pelle, mediante l'uso di un sistema inducibile esprime A-FOS, hanno dimostrato che AP-1 è

determinante per la progressione e per lo stato differenziativo del tumore. In particolare è stato visto che l'espressione di A-FOS durante l'induzione chimica del tumore, blocca lo sviluppo del tumore da papilloma a carcinoma. Invece, l'inibizione di AP-1 dopo la formazione del tumore causa la formazione di tumori sebacei invece di tumori squamosi, e la riattivazione di AP-1 causa la reversione del fenotipo. Le caratterizzazioni molecolari hanno dimostrato che AP-1 regola diversi promotori di geni coinvolti nel *pathway* di wnt, dimostrando che AP-1 può regolare il bilanciamento tra i *pathway* wnt/ β -catenina e hedgehog, che determinano rispettivamente lo stadio squamoso e sebaceo (Gerdes et al., 2006).

Un'ulteriore evidenza del ruolo di AP-1 nella tumorigenesi, è data dal fatto che soppressori tumorali sono in grado di inibire AP-1, che a loro sono regolati da AP-1. In particolare, diversi studi hanno dimostrato che c-Jun reprime l'espressione del soppressore tumorale PTEN, evidenziando così un ruolo anti-apoptotico di c-Jun. In fibroblasti di topo (NIH-3T3) l'espressione inducibile di c-Jun promuove la crescita cellulare e protegge dall'apoptosi indotta dalla mancanza di nutrienti. L'aumento di c-Jun coincide con la diminuzione di PTEN e con la concomitante attivazione del *pathway* di Akt. Viceversa, fibroblasti c-Jun^{-/-} esprimono PTEN e sono più sensibili all'apoptosi indotta dalla mancanza di siero. L'inibizione di PTEN mediante siRNA nelle cellule c-Jun^{-/-} rende le cellule meno sensibili all'apoptosi indotta (Hettinger et al., 2007). Ulteriori studi hanno dimostrato che c-Jun media la repressione di PTEN in risposta all'oncogene Ras. In particolare, l'iperespressione di H-Ras in fibroblasti di topo (NIH-3T3) causa, attraverso la via di traduzione Ras/Raf/ERK, la diminuzione dell'espressione di PTEN e induce un aumento di foci trasformanti. Inoltre, l'espressione del Ras oncogeno nei fibroblasti *knockout* per c-Jun non causa la diminuzione dell'espressione di PTEN (Vasudevan et al., 2007). A sua volta, il fattore trascrizionale AP-1 può essere regolato da soppressori tumorali, come nel caso di PDCD4. Nella linea cellulare dell'epidermide di topo JB6, l'espressione di PDCD4 correla inversamente con il grado di suscettibilità alla trasformazione indotta chimicamente. In particolare, le cellule suscettibili (JB6 P+) hanno bassi livelli di PDCD4, e formano colonie trasformanti in seguito al trattamento con il TPA. L'iperespressione di PDCD4 in JB6 P+ causa la diminuzione del numero di colonie trasformanti, e interferisce con l'attività di AP-1 (Yang et al., 2003b). Successivamente, lo stesso autore ha evidenziato che PDCD4 inibisce specificamente l'attivazione di c-Jun e c-Fos,

senza interferire sulla sintesi delle proteine JUN e FOS (Yang et al., 2003c). Nella linea cellulare di rene embrionale umano (HEK293), PDCD4 interferisce con l'attività di c-Jun, impedendo la fosforilazione da parte di JNK chinasi. In particolare, PDCD4 non sopprime l'attività di JNK, ma si lega a c-Jun impedendo alla chinasi di fosforilarlo, causando il blocco del reclutamento di p300, un co-attivatore di c-Jun (Bitomsky et al., 2004).

Come detto precedentemente, il 70% dei carcinomi papilliferi e follicolari della tiroide è dovuto a lesioni genetiche a carico dei componenti della via di trasduzione del segnale Ras/Raf/Mek. La trasformazione delle cellule di tiroide di ratto (FRTL-5) con diversi oncogeni, tra i quali *K-ras* e *H-ras*, causa la perdita del fenotipo differenziato e l'attivazione costitutiva dei pathway a valle di Ras (Cobellis et al., 2001; De Vita et al., 2005). L'attivazione del *signaling* Raf/Mek/ERK causa un forte accumulo della proteina Fra-1. Tale accumulo è dovuto sia ad un drastico incremento della stabilità della proteina dipendente dalla fosforilazione mediata dalle chinasi MEK/ERK, e sia all'autoregolazione trascrizionale mediata da un sito, presente nel primo introne del gene *fra1*, capace di legare AP-1 (Casalino et al., 2003). L'espressione di Fra1 causata dall'espressione dei proto-oncogeni *ras*, risulta essenziale per lo sviluppo del fenotipo maligno. Infatti, l'inibizione di Fra-1 mediante l'espressione di un RNA antisense causa una parziale reversione del fenotipo trasformato, evidenziando un ruolo di Fra-1 nel cambiamento di morfologia (Vallone et al., 1997). Studi recenti hanno dimostrato che Fra-1, nelle cellule di tiroide trasformate dall'oncogene *Ki-ras* (FRTL-5^{Ki-ras}), è coinvolto nella proliferazione cellulare regolando direttamente l'espressione della ciclina A2 (*ccna2*). Inoltre, nello stesso studio, è stato visto che l'inibizione di Fra-1 mediante shRNA causa un blocco proliferativo in fase G2 del ciclo cellulare e induce apoptosi (Casalino et al., 2007).

I microRNA e la tumorigenesi.

I microRNA costituiscono una classe di piccoli RNA non codificanti, di circa 20-24 nucleotidi di lunghezza. Sono trascritti prevalentemente dalla RNA polimerasi di tipo II, sotto forma di un lungo precursore (pri-miRNA) soggetto a *capping* e poliadenilazione. Successivamente, il pri-miRNA viene processato dall'RNasi III DROSHA in prodotti intermedi di ~ 65nt (pre-miRNA), i quali vengono trasportati nel citoplasma dal fattore di trasporto nucleare Exportina-5. Nel citoplasma i pre-microRNA vengono processati in trascritti maturi di ~22nt (microRNA) da una seconda RNasi III detta DICER. I microRNA maturi vengono incorporati in un complesso proteico, detto RISC, e lo indirizzano mediante appaiamento completo o parziale al 3'-UTR dell'mRNA *target* (Cai, 2004). In genere, i microRNA reprimono la traduzione dei loro mRNA bersaglio, ma possono anche destabilizzare i loro trascritti target, regolando negativamente l'espressione di una vasta frazione di messaggeri cellulari, diversamente a quanto succede con gli siRNA che agiscono su un unico *target* (Lim et al., 2005). Conseguentemente, la deregolazione di un singolo miRNA è sufficiente ad avviare alterazioni di programmi genetici implicati nella proliferazione cellulare, nel differenziamento, nell'invasione ecc. L'importanza tumorigenica dei microRNA è evidenziata in letteratura da diversi studi che mostrano i profili d'espressione di microRNA in una vasta varietà di tumori umani (Calin & Croce, 2006). I profili d'espressione di microRNA tumore-specifici possono essere predittivi per la diagnosi e la prognosi dei tumori umani, come nel caso dei tumori della mammella e del polmone (Iorio, 2005; Yu, 2007). I microRNA possono avere un grosso potenziale terapeutico per il trattamento di malattie umane. Recentemente, è stato dimostrato che la repressione di miR-122 mediante inibitori chimicamente modificati (antagomir) porta ad una duratura correzione *in vivo* dell'ipercolesterolemia (Elmén et al., 2008).

Diversi microRNA associati ai tumori mostrano un'attività oncogenica, mentre altri, regolati negativamente nelle cellule neoplastiche, agiscono come soppressori tumorali. La deregolazione d'espressione dei microRNA nei tumori può risultare da riarrangiamenti cromosomali, come per esempio la delezione che

abroga l'espressione dei proapoptotici miR15/16 in B-CLL (B-Cell Lymphatic Leukaemia). Questi microRNA sono localizzati in una regione del cromosoma 13q14 che si trova deleta in circa la metà dei casi di CLL, e sono repressi in oltre due terzi dei casi di leucemia (Calin et al., 2008). E' stato inoltre visto che miR-15/16 reprimono il prodotto dell'oncogene anti-apoptotico Bcl-2, che si trova spesso iperespresso nelle leucemie linfoidi (Cimmino et al., 2005)

Alternativamente, l'espressione deregolata dei microRNA risulta dall'attività alterata di fattori trascrizionali oncogenici o oncosoppressori, come per esempio c-Myc, E2F1, p53 e NFκB.

c-Myc codifica per un fattore trascrizionale a *helix-loop-helix*, ed è uno dei più frequenti proto-oncogeni attivati nei tumori umani. Attraverso l'attivazione e la repressione di diversi geni *target*, c-Myc regola la proliferazione cellulare, l'apoptosi e la tumorigenesi. La scoperta che c-Myc regola direttamente l'espressione del *cluster* di miR-17-92, è stata la prima evidenza del controllo diretto di un fattore trascrizionale sull'espressione di microRNA (O'donnell et al., 2005). Il cluster miR-17-92 codifica per sei microRNA (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 e miR-92-1), raggruppati in una regione di 800 bp altamente conservata del cromosoma umano 13q31.1, una regione che si trova spesso amplificata sia nei tumori ematopoietici che solidi. E' stato visto inoltre che miR-17 e miR-20a reprimono l'espressione di E2F1, un fattore trascrizionale *target* di c-Myc che promuove la progressione nel ciclo cellulare. Queste evidenze rivelano un fine meccanismo di regolazione dei segnali proliferativi, attraverso il quale c-Myc simultaneamente attiva la trascrizione e limita la traduzione di E2F1 (O'donnell et al., 2005). Recentemente è stato osservato che l'espressione dei miR-106b, miR-93 e miR-25, nei tumori gastrici, è regolata dal fattore trascrizionale E2F1, e che miR-106b e miR-93 fanno parte di un circuito di autoregolazione negativa, reprimendo l'espressione di E2F1. Inoltre, l'iperespressione dei tre microRNA causa insensibilità all'apoptosi indotta dal TGFβ, interferendo con la sintesi di p21 e Bim, due effettori a valle di TGFβ (Petrocca et al., 2008).

Il fattore trascrizionale p53 è indotto in risposta a una serie di stimoli potenzialmente oncogenici, e causa il blocco del ciclo cellulare e l'apoptosi. La mancanza dell'espressione di p53 è uno degli eventi più comuni che si riscontrano nei tumori umani. E' stato visto che, miR-34a e miR-34b/miR-34c prodotti da due

distinti loci nel genoma umano, sono bersagli trascrizionali di p53. L'espressione ectopica di questi microRNA è capace di indurre blocco del ciclo cellulare, apoptosi o senescenza in modo dipendente dal contesto cellulare; mentre l'inibizione dell'espressione dei membri della famiglia di miR-34 riduce l'apoptosi indotta da p53. La capacità di questi microRNA di indurre effetti anti-proliferativi e pro-apoptotici, coinvolge la regolazione diretta di diversi geni implicati nel controllo del ciclo cellulare (CycE2, CDK4, CDK6) e dell'apoptosi (Bcl2) (Lotterman et al., 2008)

L'attivazione costitutiva del *signaling* del fattore trascrizionale NFκB causa iperproliferazione e resistenza all'apoptosi delle cellule tumorali, e promuove l'angiogenesi e le metastasi. E' stato visto che la stimolazione della linea cellulare di AML (Acute Myeloid Leucemia) con il lipopolisaccaride (LPS), induce l'espressione di tre microRNA: miR-132, miR-146 e miR155. Nella stessa analisi è stato visto che NFκB regola direttamente l'espressione di miR-146, mediante il legame con una sequenza bersaglio presente nel promotore del microRNA. Inoltre è stato evidenziato che miR-146 fa parte di un circuito di autoregolazione negativo, causando la repressione di IRAK1 e TRAF6, due potenti induttori di NFκB (Taganov et al., 2006). In accordo a questo modello, è stato recentemente osservato, in linee cellulari di carcinoma della mammella, che l'espressione di miR-146a e miR-146b correla inversamente con l'espressione di IRAK1 e TRAF6. Inoltre, la soppressione dell'attività di NFκB inibisce la migrazione e l'invasione delle cellule di carcinoma della mammella (Bhaumik et al., 2008).

Sulla base di tali evidenze ci siamo posti i seguenti scopi:

- a) Identificazione di microRNA regolati da AP-1 in seguito all'attivazione di Ras.**
- b) Ruolo dei miR nella trasformazione neoplastica.**
- c) Identificazione di *target* dei microRNA regolati da AP-1.**
- d) Identificazione di possibili meccanismi regolativi tra AP-1 / microRNA/target coinvolti nella trasformazione da parte di Ras.**

RISULTATI

Come sistema sperimentale per i miei studi ho utilizzato una linea cellulare differenziata derivata dall'epitelio di tiroide di ratto (FRTL-5 Cl2). Queste cellule mantengono inalterate tutte le caratteristiche differenziative delle cellule componenti il follicolo tiroideo, quali: l'espressione del recettore per il TSH, la sintesi e la secrezione della tireoglobulina (TG), la sintesi della tireoperossidasi (TPO) e la sintesi del trasportatore necessario per la captazione dello iodio (NIS) (Ambesi-Impiombato et al., 1980). Tale linea cellulare rappresenta un sistema modello *in vitro* per lo studio della trasformazione maligna epiteliale, in quanto mostra suscettibilità alla trasformazione mediata da un solo oncogene.

Per poter analizzare gli eventi precoci della promozione tumorale, mi sono servito di un sistema inducibile di FRTL-5 (FRTL-5^{ER/RAS}) in cui è stabilmente espressa la proteina di fusione composta dall'oncoproteina H-RAS^{V12} e il recettore degli estrogeni (ER), in grado di legare il 4-OH-Tamoxifene (4-OHT) e non l'estrogeno.

L'attivazione dell'oncogene causa la perdita del fenotipo differenziato, dipendentemente dai livelli di accumulo dell'oncoproteina. In particolare, la perdita dei caratteri differenziativi della tiroide si ha solo in presenza di alti livelli d'espressione di Ras. Mentre la crescita indipendente dal TSH è indotta in presenza sia di alti che bassi livelli dell'oncoproteina. Inoltre, solo un accumulo significativo di Ras è capace di inibire l'espressione di Titf1 e Pax8, due fattori trascrizionali essenziali per il mantenimento del fenotipo differenziato (De Vita et al., 2005).

In seguito all'aggiunta del tamoxifene è possibile seguire cinematicamente l'induzione dell'oncogene H-Ras^{V12} e tutti gli eventi precoci della promozione tumorale, compresi i cambiamenti a carico del complesso AP-1.

Cambiamento della composizione del complesso AP-1 in seguito all'induzione dell'oncoproteina Ras.

Allo scopo di caratterizzare l'espressione dei singoli membri appartenenti alle famiglie JUN e FOS in seguito all'attivazione dell'oncoproteina RAS è stata fatta un'analisi di western blotting (Figura 1). Come si può notare tra i membri della famiglia JUN, c-Jun e JunB vengono indotti e raggiungono un picco di accumulo già a 3 ore dall'aggiunta del tamoxifene; mentre JunD non mostra significative variazioni nelle 24 ore di induzione dell'oncogene. C-Fos viene indotto rapidamente già a 1 ora, raggiunge un picco di accumulo a 3 ore, e scompare tra 3 e 6 ore. La scomparsa di c-Fos coincide con l'inizio dell'accumulo di Fra-1, che aumenta progressivamente da circa 3 ore, e raggiunge un plateau intorno alle 15 ore. Fra-2 mostra un caratteristico andamento bifasico, e cioè subisce un leggero decremento subito dopo l'induzione, seguito da un aumento qualche ora dopo, sebbene, dopo 24 ore, il livello di proteina è leggermente diminuito rispetto al controllo.

Questi dati suggeriscono che mentre a 3 ore dall'induzione di Ras il complesso AP-1 è formato prevalentemente da c-Jun e JunB assieme a c-Fos, a 24 ore AP-1 include le proteine JUN assieme a Fra-1 e ad una piccola quantità di Fra-2. L'alternanza tra c-Fos e Fra-1 suggerisce che, subito dopo l'attivazione di Ras, l'induzione transiente di c-Fos è necessaria per la successiva espressione auto-regolata di Fra-1 (Casalino et al., 2003), il quale sembra costituire il maggior componente dell'eterodimero AP-1 a 24 ore dall'induzione di Ras.

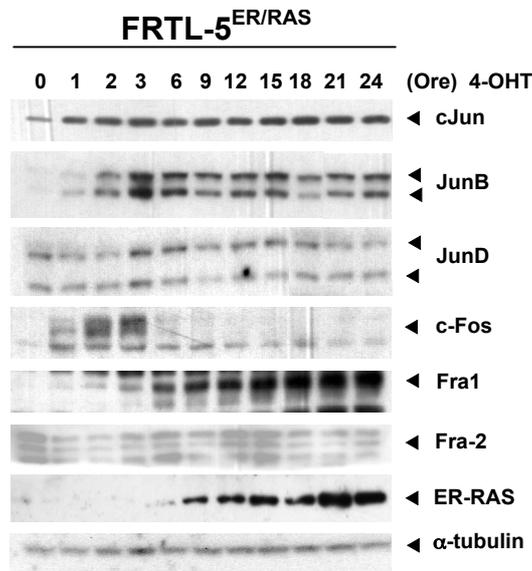


Figura 1. Espressione dei componenti di AP-1 in risposta all'induzione dell'oncoproteina H-RAS^{V12}. Ai tempi indicati di trattamento con 4-OHT, gli estratti di proteine totali sono stati analizzati mediante *western blotting* con gli anticorpi contro i singoli componenti di AP-1. L'incremento dipendente dal tempo della proteina chimerica ER-RAS^{V12}, evidenziata con l'anticorpo anti-RAS, è probabilmente dovuto alla stabilizzazione, come osservato per altre proteine di fusione con ER.

Inibizione stabile dell'attività di AP-1 mediante un mutante della proteina c-Fos ad attività dominante negativa.

Per poter analizzare il ruolo di AP-1 in seguito all'attivazione di Ras, abbiamo ottenuto una linea cellulare di FRTL-5^{ER/RAS} che esprime stabilmente un derivato della proteina A-FOS fuso alla proteina GFP. A-FOS è un mutante ad attività dominante negativa ottenuto dalla proteina c-Fos, ed è capace di legare con avidità i membri di AP-1 e di spiazzare il legame del dimero al DNA (Bahassi et al., 2004; Olive et al., 1997).

Le cellule che esprimono l'inibitore di AP-1, dette A-FOS, mostrano una diminuzione drastica dell'attività di legame alla sequenza TRE, sia a livello basale che dopo l'induzione di Ras (Figura 2a). L'analisi di diversi *target* di AP-1 mostra che l'espressione dell'oncoproteina Fra-1, autoregolata da AP-1, è completamente inibita dal dominante negativo. Inoltre, l'induzione del trascritto di ciclina D1 da parte di Ras è significativamente attenuata, mentre l'induzione del messaggero della metalloproteasi MMP9 è completamente inibita dall'espressione di A-FOS (Figura 2b). La soppressione dell'attività AP-1 coincide con una significativa

inibizione del fenotipo trasformato che si ha dopo l'attivazione dell'oncogene (Figura 2c). Infine, l'analisi della vitalità cellulare in presenza di tamoxifene mostra una velocità di crescita significativamente ridotta nelle cellule A-FOS, comparata a quella delle cellule parentali (Figura 2d).

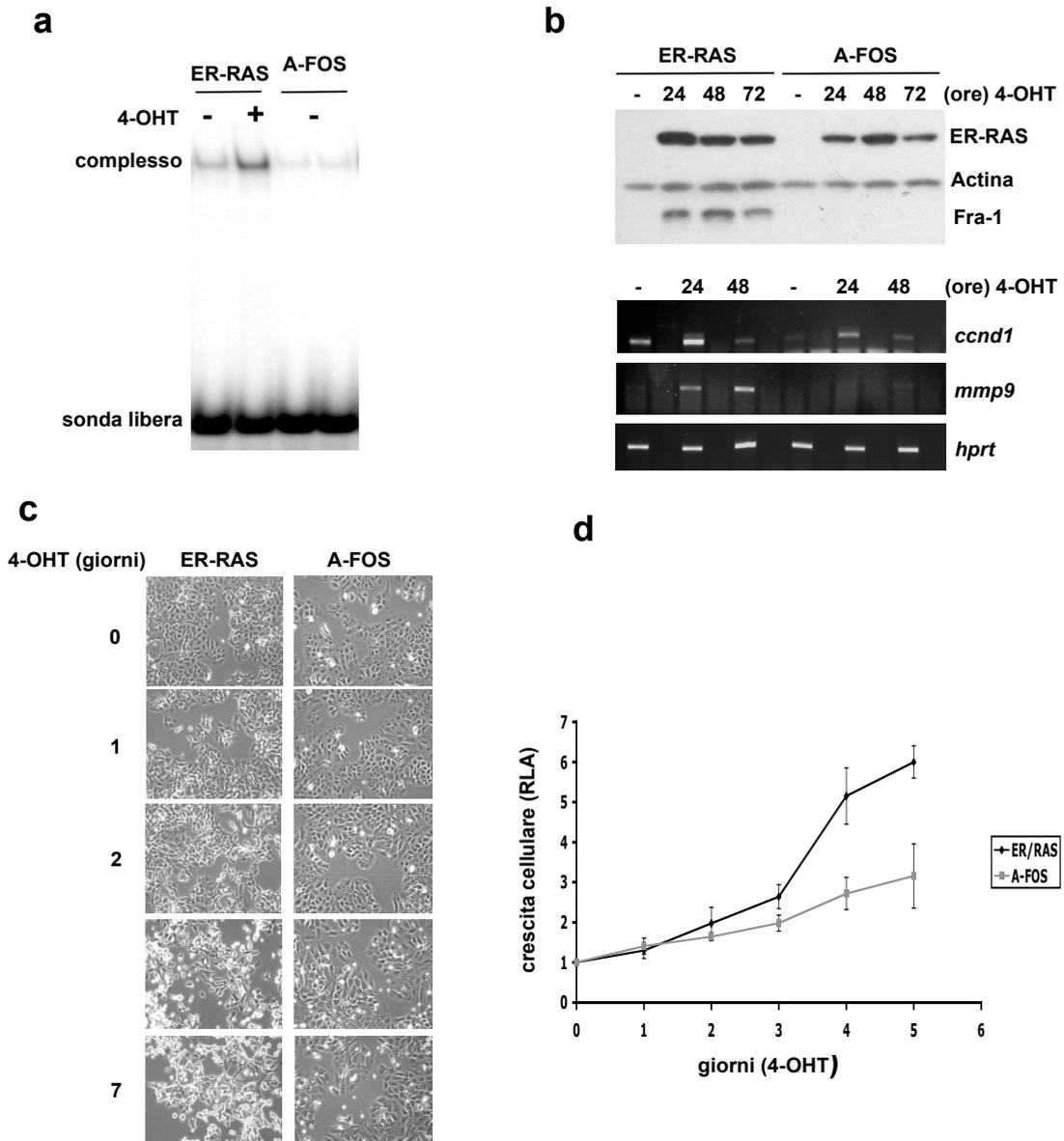


Figura 2. Caratterizzazione del *pool* di cellule che esprimono stabilmente la proteina chimerica dominante negativo A-FOS e GFP (GFP/A-FOS). **(a)** EMSA. Gli estratti nucleari sono stati preparati a 24 ore dall'induzione e incubati con una sonda che lega AP-1 (TRE della collagenasi). **(b)** Espressione indotta da RAS dei geni *target* di AP-1 nelle cellule A-FOS trattate con 4-OHT, paragonate alle cellule parentali ER-RAS. In alto *western blotting*, in basso RT-PCR. **(c)** Fotografia al microscopio a contrasto di fase: cambiamenti morfologici indotti dal trattamento con 4-OHT delle cellule parentali paragonate alle cellule A-FOS. **(d)** Vitalità cellulare delle cellule A-FOS confrontate alle cellule parentali. Le cellule sono cresciute in presenza di TSH. La vitalità è stata evidenziata mediante saggio di luminescenza. RLA, *Relative Luciferase Activity*.

AP-1 media l'induzione di miR-21 in risposta all'oncoproteina Ras.

Per identificare gli onco-microRNA regolati da AP-1 in risposta all'oncoproteina Ras, abbiamo analizzato l'espressione dipendente da Ras e da AP-1 mediante analisi di microarray, utilizzando un chip contenente circa 400 sonde per microRNA umani e di topo. L'analisi ha evidenziato che ben 56 microRNA vengono indotti dall'attivazione di Ras, e che l'espressione di 4 di questi viene inibita dalla presenza dell'inibitore di AP-1. Inoltre, è stato osservato che altri 18 microRNA sono indotti quando l'attività di AP-1 viene inibita dal dominante negativo in presenza di tamoxifene.

Tra i 4 microRNA non indotti nella linea cellulare A-FOS in seguito all'induzione di Ras, miR-21 è senza dubbio il microRNA di maggior importanza oncologica. Come evidenziato dall'analisi di profili d'espressione di microRNA, miR-21 è fortemente associato ai tumori, in quanto è iperespresso in gran parte dei tumori finora analizzati (He et al., 2005; Pallante, 2006; Volinia et al., 2006).

L'analisi di validazione mediante qRT-PCR evidenzia che miR-21 viene indotto da Ras di circa 5 volte nella linea parentale, e meno di 2 volte nella linea A-FOS (Figura 3a). Successivamente, abbiamo analizzato l'andamento nel tempo dell'induzione di miR-21 mediante *primer extension*. Il miR-21 maturo compare tra le 12 e le 24 ore d'induzione, e raggiunge un massimo a 48 ore, invece nelle cellule A-FOS non si osserva induzione del miR (Figura 3b). Siccome con la *primer extension* non è possibile visualizzare il pre-miR-21, abbiamo messo a punto il Northern blotting. L'ibridazione con una sonda chimicamente modificata LNA (Locked Nucleic Acid), mostra che il pre-miR-21 di 92 nt è molto meno abbondante del maturo. Le due cinetiche d'induzione del pre e del maturo miR-21 sono paragonabili, hanno un'espressione intermedia a 24 ore, e raggiungono un plateau a 48 ore che rimane costante per una settimana. Nessuna induzione si può osservare nelle cellule esprimenti l'inibitore di AP-1 (Figura 3c). Data la discrepanza tra l'induzione precoce dei componenti di AP-1 (c-Jun, JunB e c-Fos; Figura 1), e l'accumulo ritardato del pre e maturo miR-21, abbiamo analizzato l'induzione del trascritto primario (pri-miR-21). L'analisi della cinetica d'induzione mediante RT-PCR mostra che il pri-miR-21 è già presente a 3 ore, e non aumenta nell'arco delle successive 24 ore di trattamento con il tamoxifene

(Figura 3d). Quindi, il ritardato accumulo di miR-21 maturo può essere dovuto alla maturazione post-trascrizionale del suo trascritto primario indotto da Ras.

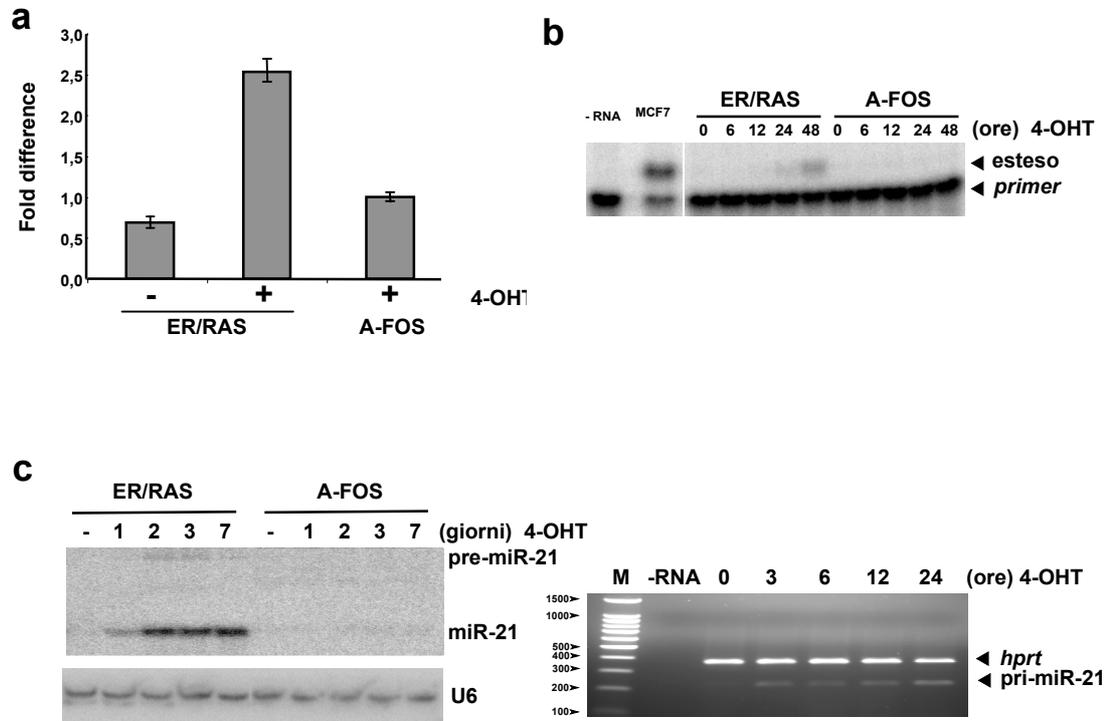


Figura 3. Analisi nel tempo dell'espressione di miR-21, pre-miR-21 e pri-miR-21 nelle linee cellulari ER-RAS e A-FOS. **(a-c)** Induzione di miR-21 nelle cellule A-FOS paragonate alle cellule ER-RAS. **(a)** Analisi mediante Real-Time PCR (TaqMan) dell'induzione di miR-21 (24 ore d'induzione). **(b)** Analisi del *time course* (Primer Extension) dell'induzione di miR-21 da parte del 4-OHT. Il primer di 22 nt e il prodotto allungato di 27 nt sono rispettivamente indicati. **(c)** Analisi mediante Northern blotting dell'induzione di miR-21 e pre-miR-21. Il miR di 22nt e il suo precursore di 92 nt (ratto) sono rispettivamente indicati, snRNA U6 è stato utilizzato come controllo di caricamento. **(d)** Analisi dell'induzione nel tempo (RT-PCR semi-quantitativa) del messaggero di miR-21 (pri-miR-21), come controllo di caricamento è stato usato il gene dell'*hprt*.

Fra-1 è reclutato assieme a c-Jun e JunB su una regione conservata fiancheggiante il 5' di miR-21.

I risultati della Figura 3 evidenziano che l'attività di AP-1 è necessaria per l'induzione di miR-21 da parte di Ras. Per verificare se miR-21 può essere un *target* trascrizionale diretto di AP-1, abbiamo analizzato l'interazione *in vivo* dei componenti di AP-1 con la regione del promotore di miR-21. Il miR umano deriva da un pre-miR-21 di 72 nt, maturato da un lungo mRNA non codificante di circa 4400 nt, che comprende parte del gene *TMEM49*. Il pri-miR-21 è trascritto dalla polimerasi II, e il suo sito d'inizio della trascrizione è stato localizzato in un introne del gene *TMEM49*. Nonostante i due messaggeri, *TMEM49* e pri-miR-21, hanno una regione in comune, essi sono regolati autonomamente (Fujita & Iba, 2008). Per analizzare l'associazione di c-Jun con la regione fiancheggiante il 5' di miR-21, dedotta dall'allineamento con la sequenza umana, abbiamo fatto un saggio di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) di estratti di cellule ER/RAS trattate con il tamoxifene. L'analisi di ChIP, usando 5 *primer* che si estendono lungo 4 kb a cavallo dell'inizio della trascrizione, ha evidenziato l'associazione di c-Jun con un frammento di 328 bp (Figura 4a). L'istone H3 acetilato in Ser10 (Ac-H3) è individuato sullo stesso frammento di cromatina. Verosimilmente un frammento a valle del precedente, che mostra un reclutamento quasi nullo di c-Jun, è fortemente arricchito dall'immunoprecipitazione della cromatina con l'anticorpo specifico anti-AcH3 in Ser10 (Figura 4b). Avendo identificato la regione del promotore di miR-21 che interagisce con c-Jun, abbiamo analizzato il reclutamento degli altri componenti di AP-1. In particolare, abbiamo dimostrato che oltre a c-Jun, anche Fra-1 e JunB, sono reclutati dopo 48 ore dall'induzione di Ras, mentre JunD si trova associato anche in assenza d'induzione (Figura 4c). Quindi, in assenza di Ras, il complesso AP-1 legato alla regione fiancheggiante il promotore di miR-21 è probabilmente composto da dimeri JunD e Fra-2, mentre dopo l'induzione di Ras il complesso associato alla cromatina è principalmente composto da eterodimeri formati da Fra-1 e dai tre partner della famiglia JUN. L'analisi bioinformatica, mediante il *software* TRANSFAC, per potenziali siti AP-1 nella regione fiancheggiante il 5' del pri-miR-21 di ratto, ha evidenziato la presenza di 3 siti non canonici di AP-1 evolutivamente conservati e raggruppati in una regione di 205 bp. Inoltre, è stata

evidenziata un'altra sequenza AP-1, a monte di tale regione, che non mostra conservazione inter-specie. Le 3 potenziali sequenze TRE sono contenute nel frammento fortemente arricchito dal saggio di immunoprecipitazione. Perciò l'induzione da parte di Ras del pri-miR-21 è mediata da almeno uno dei tre potenziali siti AP-1. L'allineamento tra diverse specie ha rivelato una conservazione di sequenza lungo la regione di 205 bp contenente i siti AP-1, tranne un'inserzione di 12 nucleotidi nelle sequenze di topo e ratto.

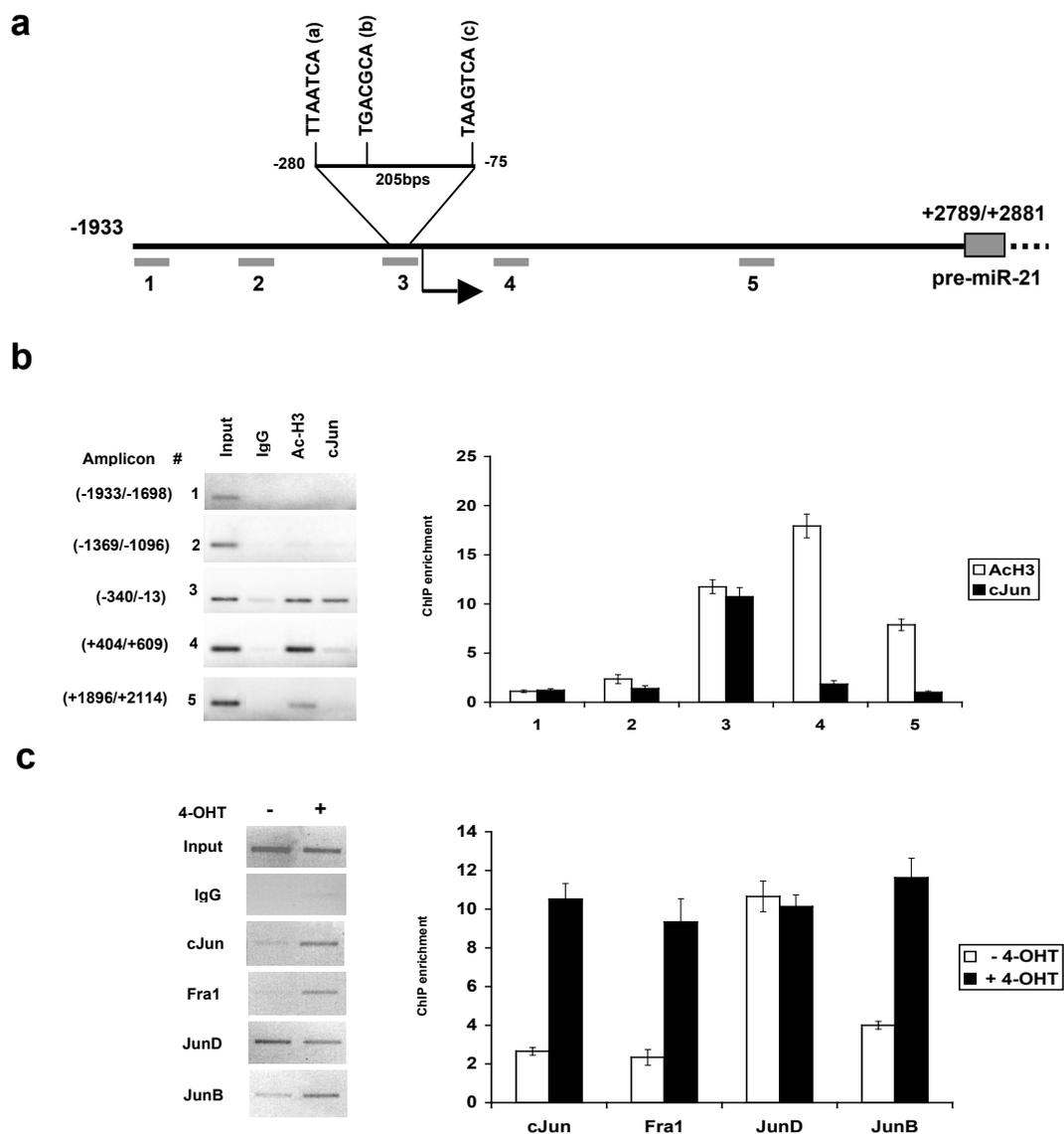


Figura 4. Fra-1 è reclutato assieme a c-Jun e JunB su una regione fiancheggiante il 5' di miR-21. (a) Diagramma della regione fiancheggiante il 5' del pri-miR-21 di ratto e degli ampliconi utilizzati per la ChIP. L'ingrandimento mostra la localizzazione dei tre putativi siti di AP-1. (b) Identificazione delle regioni che interagiscono con c-Jun e istone H3 acetilato, mediante l'uso di differenti ampliconi a cavallo del sito d'inizio della trascrizione di miR-21. L'analisi di ChIP è stata fatta con la cromatina di cellule ER-RAS trattate per 48 ore con 4-OHT. Sinistra: PCR semi-quantitativa. Destra: Real Time PCR. (c) Reclutamento (48 ore di 4-OHT) di Fra-1 e dei membri della famiglia

JUN sulla regione del promotore di miR-21, amplificata dall'amplicone n°3. Sinistra: PCR semi-quantitativa. Destra: Real Time PCR (Per le semi-quantitativa e Real Time PCR sono stati usati diversi *primer*). I risultati ottenuti mediante Real Time PCR sono espressi come arricchimento dei frammenti di DNA associati alla cromatina immunoprecipitati con lo specifico anticorpo rispetto al controllo negativo (IgG). Le barre di errore indicano la deviazione standard

Identificazione dei siti AP-1 del promotore di miR-21 sensibili all'attivazione di Ras.

Per testare la sensibilità a Ras e AP-1 della regione fiancheggiante il 5' del pri-miR-21, abbiamo clonato il frammento precedentemente caratterizzato per l'interazione con AP-1 a monte di un promotore eterologo che guida la trascrizione del gene *reporter* della luciferasi. In seguito alla trasfezione abbiamo osservato che il candidato *enhancer* di miR-21 viene indotto da tamoxifene. Inoltre, la co-espressione con il dominante negativo GFP-A-FOS diminuisce drasticamente sia l'attività basale che indotta da Ras (Figura 5a), dimostrando che AP-1 media l'induzione trascrizionale di miR-21 da parte di Ras. Per definire il contributo relativo di ciascuno degli elementi di AP-1, abbiamo analizzato diversi costrutti del promotore di miR-21 contenenti mutazioni in ognuna o tutte e tre le sequenze TRE (Fujita et al., 2008). Sebbene l'inattivazione dei due siti a monte influisca minimamente sull'induzione del promotore di miR-21 da parte di Ras, il sito di AP-1 a valle influisce drasticamente e in modo paragonabile alla mutazione tripla (Figura 5b).

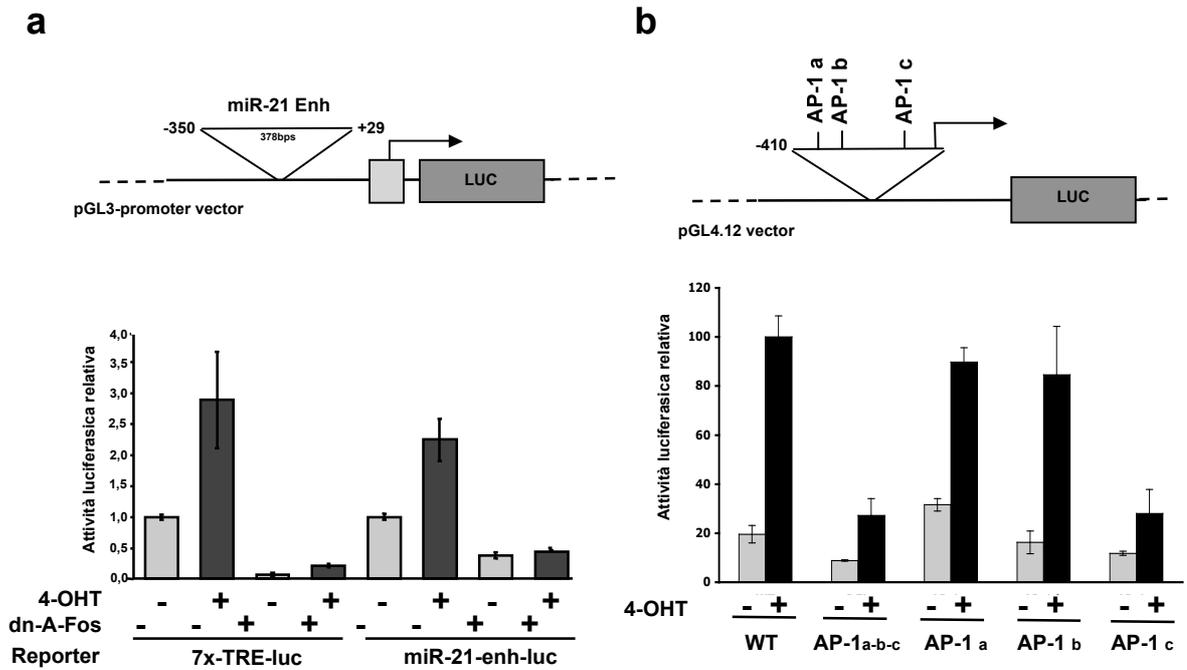


Figura 5. Identificazione dei siti AP-1 del promotore di miR-21 che rispondono a RAS. **(a)** Analisi di co-trasfezione (-/+ dn A-FOS) del costrutto *reporter*, rappresentato in alto, contenente la regione di miR-21 (-350/+29) clonata a monte del promotore di SV40 in pGL3. Il controllo positivo (7XTRE) contiene un multimerico del sito AP-1 del gene della collagenasi. **(b)** Analisi del promotore di miR-21 (-410/+38) contenente mutazioni singole e multiple nei siti AP-1 (Fujita et al., 2008). Le lettere si riferiscono alle mutazioni puntiformi che inattivano il sito AP-1 a monte (a), intermedio (b) e a valle (c), assieme alla tripla mutazione (a-b-c). Le cellule ER-RAS sono state trattate con 4-OHT per 48 ore dopo la trasfezione. I valori dell'attività della luciferasi rappresentano la media tra tre esperimenti indipendenti, ognuno dei quali comprende i campioni in triplicato.

PDCD4 e PTEN sono regolati negativamente in risposta a Ras attraverso un meccanismo dipendente da AP-1 e miR-21.

Diversi trascritti *target* di miR-21, inclusi gli mRNA codificanti per i soppressori tumorale PDCD4 e PTEN, sono stati validati sperimentalmente. È stato visto che la mancata espressione di PTEN e PDCD4 correla fortemente con la maggior parte dei tumori analizzati.

L'analisi dell'espressione di PDCD4 e PTEN mostra che entrambe le proteine sono inibite dall'induzione di Ras nella linea cellulare parentale (Figura 6a). PDCD4, rappresentato da un doppietto che riflette probabilmente distinte isoforme di fosforilazione, è completamente represso dopo 72 ore trattamento con il tamoxifene, mentre PTEN subisce un piccolo decremento. La repressione mediata da Ras di entrambe le proteine è completamente annullata in assenza dell'attività di AP-1, come mostrato dall'analisi delle cellule A-FOS.

Per capire se la regolazione negativa di PDCD4 e PTEN è mediata da miR-21, abbiamo inibito l'espressione del miR mediante l'uso di un inibitore chimicamente modificato (anti-miR-21 LNA). L'inibizione di miR-21 è stata monitorata usando un costrutto contenente la sequenza complementare di miR-21 inserita a valle del gene *reporter* della luciferasi (Frankel et al., 2007). Il saggio mostra che l'attività del *reporter* dipendente da miR-21 diminuisce significativamente in seguito all'induzione con il tamoxifene. L'inibizione è completamente recuperata dall'inibitore di miR-21. Inoltre, l'aumento dell'attività basale del *reporter* nelle cellule trattate con l'anti-miR-21, riflette probabilmente l'inibizione di una piccola quantità di miR-21 espressa nelle cellule non indotte (Figura 6b). L'effettiva inibizione di miR-21 è confermata mediante Northern blotting. L'espressione di miR-21 è completamente repressa dalla trasfezione dell'inibitore a tutti i tempi dell'induzione con il tamoxifene (Figura 6c). L'analisi d'immunoblotting mostra che, a 48 e 72 ore, coincidenti con l'accumulo massimo di miR-21, la repressione di PDCD4 indotta da Ras è completamente antagonizzata dall'anti-miR-21, paragonata alle cellule trasfettate con l'oligo di controllo. Perciò, miR-21 è responsabile della regolazione negativa di PDCD4 in risposta all'oncoproteina Ras. Diversamente da PDCD4, l'espressione di PTEN è solo parzialmente inibita dall'induzione di Ras. Tuttavia, la repressione parziale di

PTEN è abrogata dall'anti-miR-21, e quindi anche PTEN è bersagliato da miR-21 in questo sistema cellulare (Figura 6c).

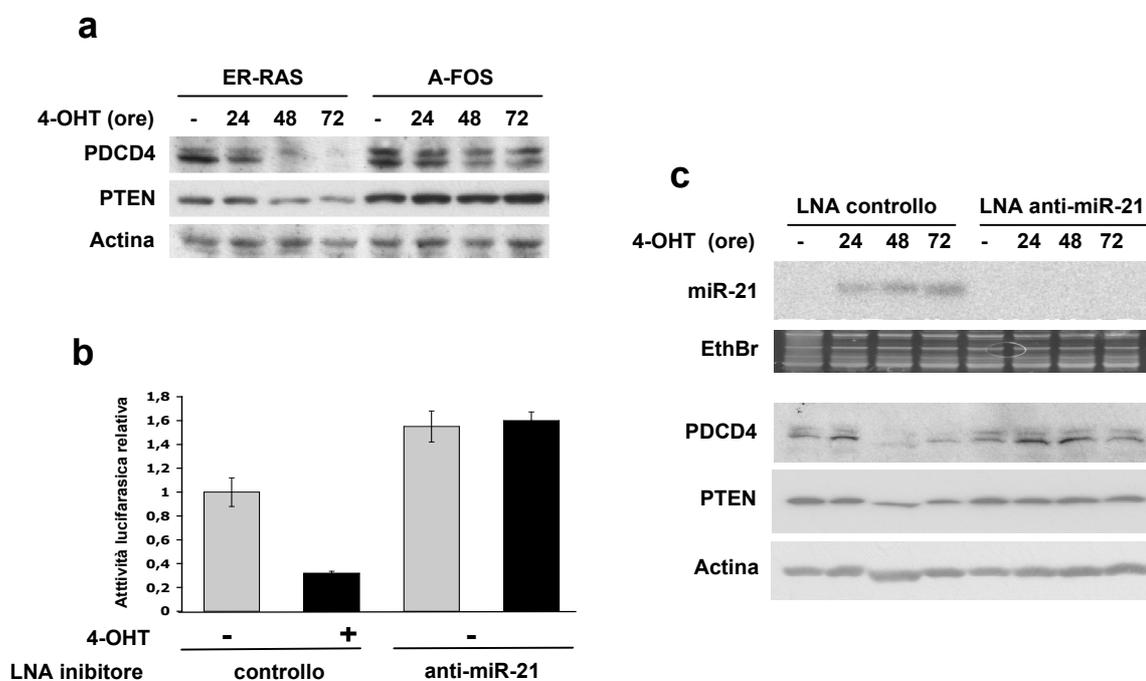


Figura 6. PDCD4 e PTEN sono repressi in risposta a RAS attraverso un meccanismo dipendente da AP-1 e miR-21. (a) Analisi mediante *Western blotting* di PDCD4 e PTEN nelle cellule ER-RAS e A-FOS indotte con 4-OHT. (b) Inibizione mediata da RAS e miR-21 di un costrutto *reporter* di miR-21. Il pmiR-21-luc, derivato dal pMIR-REPORT, contenente una sequenza complementare a miR-21 a valle della luciferasi, è stato co-trasfettato con l'oligo a LNA anti-miR-21 o di controllo, nelle cellule ER-RAS. L'attività della luciferasi è stata misurata dopo 72 ore dall'induzione con 4-OHT. (c) Effetto dell'inibizione di miR-21 sulla repressione di PDCD4 e PTEN indotta da RAS. Le cellule ER-RAS sono state trasfettate con gli oligo prima dell'induzione con 4-OHT per i tempi indicati. L'entità dell'inibizione di miR-21 è stata controllata mediante Northern blotting.

La repressione di PDCD4 mediata da miR-21 è necessaria per la piena induzione dell'attività di AP-1 in risposta a Ras.

PDCD4 (Programmed Cell Death 4) è una proteina che lega il fattore d'inizio della traduzione eIF4A, inibisce la traduzione e agisce come soppressore tumorale (Suzuki et al., 2008). E' stato riportato che PDCD4 inibisce l'attività di AP-1 (Wang et al., 2008; Yang et al., 2003b), probabilmente interferendo con il *pathway* JNK/c-Jun (Bitomsky et al., 2004; Yang et al., 2006). Per testare l'attività inibitoria di PDCD4 nelle cellule FRTL-5^{ER/RAS}, abbiamo analizzato l'induzione da parte del tamoxifene di un *reporter* di AP-1, in presenza di quantità crescenti di un vettore d'espressione di PDCD4. Abbiamo anche analizzato l'attività inibitoria di PDCD4 nei confronti dell'eterodimero forzato cJun/Fra-1 espresso ectopicamente. L'analisi di co-trasfezione mostra che PDCD4 diminuisce significativamente sia l'attività di AP-1 indotta dall'oncoproteina Ras (Figura 7a), che l'attività indotta dalla co-espressione dell' eterodimero forzato c-Jun/Fra-1 (Figura 7b), che rappresenta uno dei maggiori dimeri di AP-1 indotti da Ras.

Avendo dimostrato che AP-1 induce miR-21, e sapendo che PDCD4 inibisce l'attività di AP-1, abbiamo postulato che l'espressione di miR-21 potrebbe essere necessaria per la piena attivazione di AP-1 in risposta all'oncoproteina Ras. Perciò, abbiamo analizzato l'effetto dell'inibizione di miR-21 sull'attività del *reporter* di AP-1. Come in Figura 6c, abbiamo inibito miR-21 mediante trasfezione dell'oligo anti-miR-21 prima dell'aggiunta del tamoxifene. Sebbene la cotrasfezione con l'oligo di controllo non influisce con l'attività indotta da Ras del *reporter* di AP-1, l'anti-miR-21 indebolisce significativamente l'attività di AP-1 indotta dal tamoxifene, e non influenza l'attività basale delle cellule non indotte. Per capire se l'induzione ridotta di AP-1 è conseguenza dell'aumento dell'espressione di PDCD4 dovuto all'inibizione di miR-21, abbiamo verificato l'attività del *reporter* di AP-1 in presenza dell'inibitore di miR-21 assieme al siRNA di PDCD4. I risultati mostrano che il *knockdown* di PDCD4 induce drasticamente l'attività di AP-1, come si vede dall'aumento dei livelli, sia basale che indotto dal tamoxifene, del *reporter* cotrasfettato. L'effetto del *knockdown* di PDCD4 è maggiore in assenza dell'inibitore di miR-21, probabilmente a causa dell'incompleta soppressione che si ha in presenza di entrambi gli inibitori (Figura 7c). In breve, i nostri dati mostrano che l'espressione

di miR-21 e la conseguente repressione di PDCD4, sono necessarie a raggiungere la massima induzione di AP-1 in risposta a Ras.

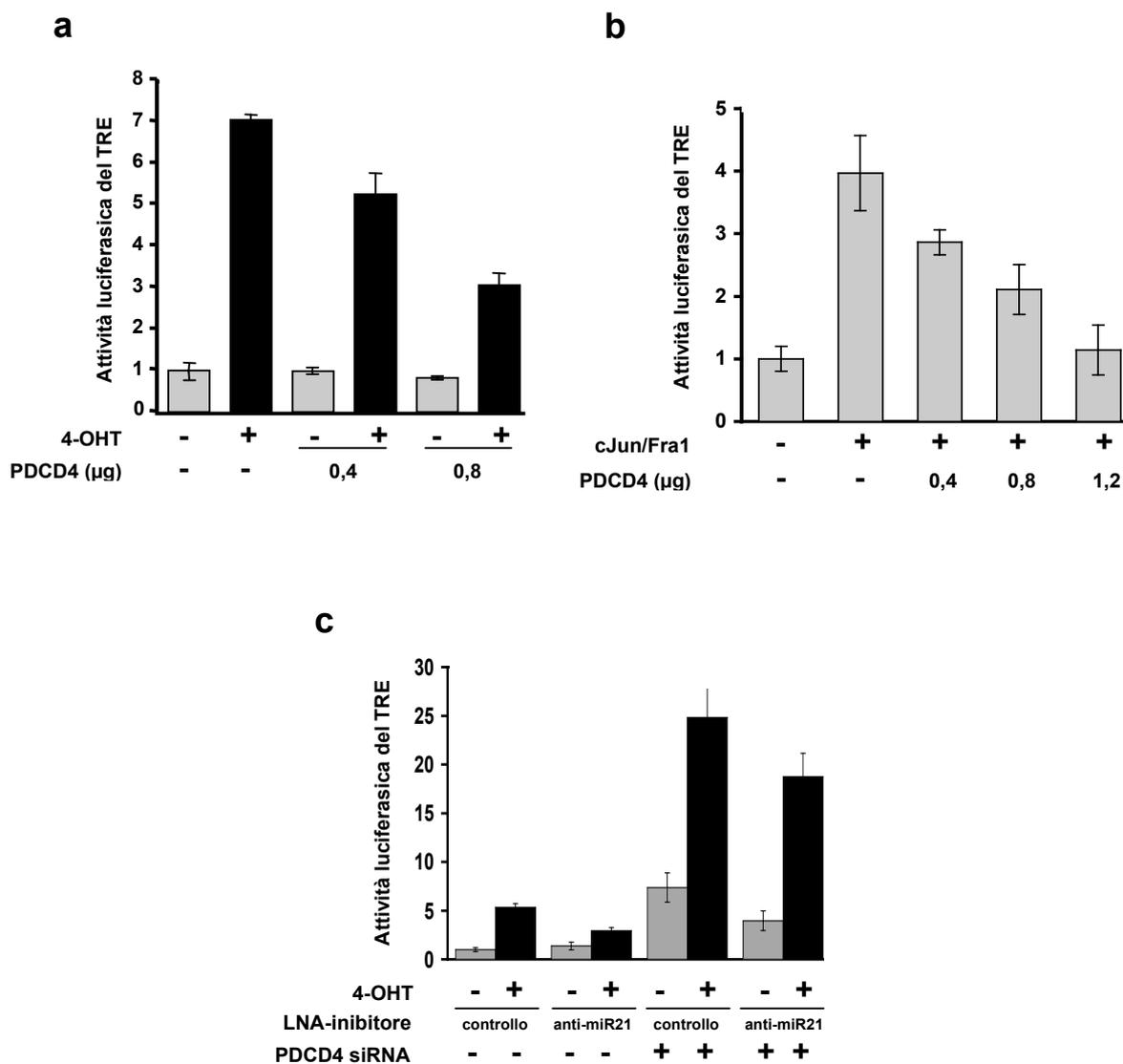


Figura 7. La repressione mediata da miR-21 di PDCD4 è necessaria per la piena induzione dell'attività di AP-1 in risposta a RAS. L'attività luciferasica è stata saggiata con il *reporter* di AP-1 (7X TRE-luc), co-trasfettato con: i vettori d'espressione PDCD4 e/o c-Jun/Fra-1, LNA anti-miR-21, LNA controllo, dsRNA, siRNA di PDCD4. (a) Effetto dell'iperespressione di PDCD4 sull'attività del *reporter* di AP-1 indotto da RAS (72 ore). (b) Effetto di PDCD4 sull'attività del *reporter* di AP-1 indotto dall'eterodimero forzato c-Jun/Fra-1. (c) Effetto dell'inibizione di miR-21 e/o PDCD4 sull'attività, basale e indotta dal 4-OHT, del *reporter* di AP-1. L'oligo anti-miR-21 o di controllo e siRNA di PDCD4 sono co-trasfettati 14 ore prima del trattamento con 4-OHT (72 ore). I valori dell'attività della luciferasi rappresentano la media tra tre esperimenti indipendenti, ognuno dei quali comprende i campioni in triplicato.

MiR-21 controlla positivamente la vitalità delle cellule di tiroide in risposta all'oncoproteina Ras.

Abbiamo investigato il ruolo di miR-21 nel fenotipo trasformato delle cellule FRTL-5^{ER/RAS} dato dall'induzione di Ras, trattando le cellule con l'oligo anti-miR-21. Abbiamo visto che i cambiamenti morfologici indotti dal tamoxifene (Figura 2c), non risentono della trasfezione dell'anti-miR-21. Invece, la proliferazione diminuisce significativamente quando le cellule trattate con il tamoxifene sono trasfettate con l'anti-miR-21, rispetto alle cellule trasfettate con l'oligo di controllo (Figura 8a). Abbiamo postulato che la mancanza di miR-21 potrebbe essere responsabile, almeno in parte, della crescita compromessa delle cellule che esprimono la proteina inibente A-FOS (Figura 2d). Perciò, abbiamo analizzato l'effetto dell'espressione ectopica di miR-21 nella linea cellulare A-FOS, mediante la trasfezione del precursore di miR-21 (pre-miR-21). La vitalità cellulare aumenta significativamente nelle cellule A-FOS che iper-esprimono il pre-miR-21, rispetto alle stesse cellule trasfettate con un dsRNA di controllo (Figura 8b).

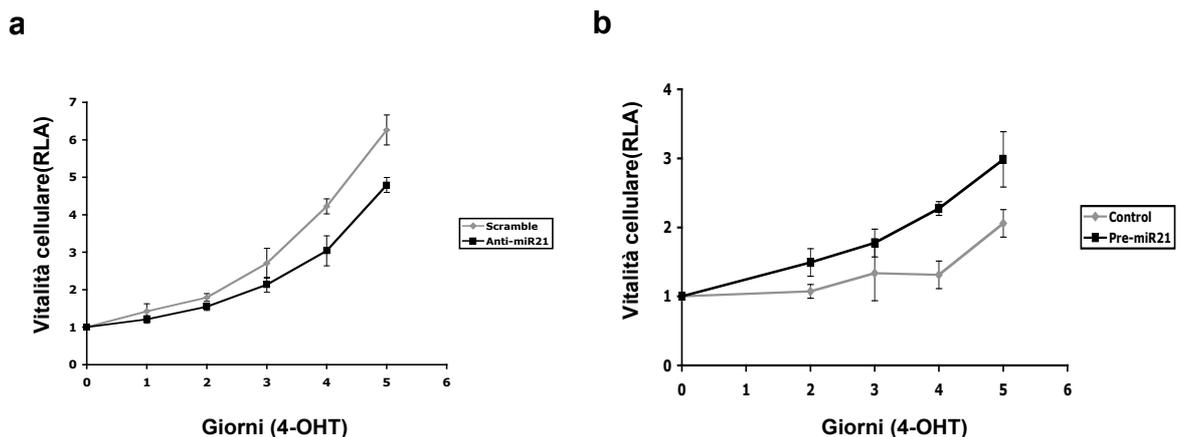


Figura 8. miR-21 controlla positivamente la vitalità delle cellule di tiroide in risposta all'oncoproteina RAS. **(a)** Proliferazione delle cellule ER-RAS indotte con 4-OHT e trasfettate con LNA anti-miR-21 o LNA di controllo. **(b)** Proliferazione delle cellule A-FOS indotte con 4-OHT

trasfettate con il precursore di miR-21 (pre-miR-21), paragonate con il controllo negativo (dsRNA). La vitalità è stata evidenziata mediante saggio di luminescenza. RLA, *Relative Luciferase Activity*.

Questi risultati suggeriscono che, attraverso il controllo positivo sulla vitalità cellulare, miR-21 è determinante per l'effetto di AP-1 sulla crescita delle cellule che esprimono l'oncoproteina Ras.

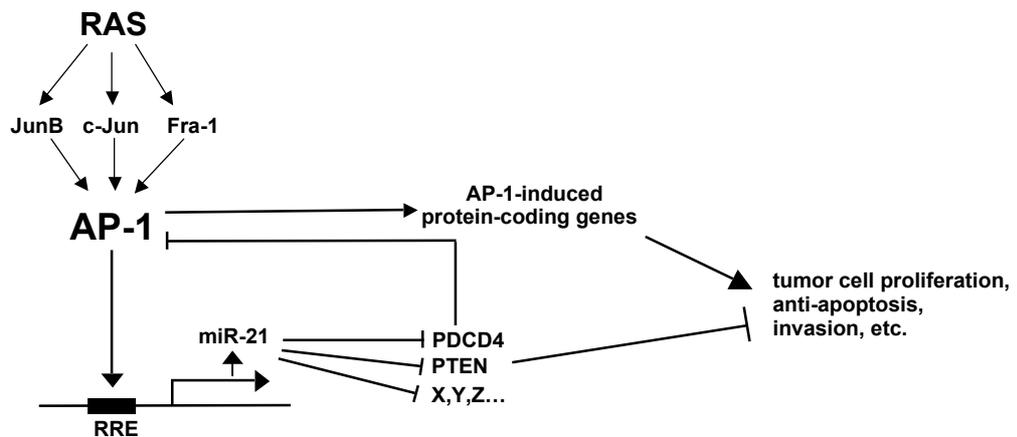


Figura 9. Schema delle interazioni funzionali tra AP-1, miR-21 e PDCD4 nella tumorigenesi indotta dall'oncogene RAS. Sono mostrati solo i principali componenti di AP-1 indotti da RAS. RRE indica l'*enhancer* che risponde a RAS e regolato da AP-1, del promotore di miR-21. (X,Y,Z...) indicano i trascritti *target* di miR-21 non ancora identificati.

Discussione

Studi recenti hanno dimostrato che i micro-RNA coinvolti nella tumorigenesi svolgono un ruolo chiave come bersagli di fattori trascrizionali oncogenici o oncosoppressori, come c-Myc e p53 (He et al., 2007; O'donnell et al., 2005). In questo lavoro, abbiamo identificato l'onco-microRNA-21 come bersaglio trascrizionale del complesso AP-1 in risposta all'oncoproteina Ras. MiR-21 indotto da AP-1 controlla positivamente la crescita delle cellule di tiroide di ratto e regola negativamente i soppressori tumorali PDCD4 e PTEN. A sua volta, l'inibizione di PDCD4 contribuisce all'incremento dell'attività di AP-1, dimostrando così un nuovo meccanismo di autoregolazione di AP-1 nella trasformazione indotta da Ras. L'induzione di miR-21 da parte di Ras è caratterizzata da un ritardo tra l'aumento precoce dell'attività di AP-1, e l'accumulo tardivo di miR-21 maturo. Tale ritardo risulta dal meccanismo di maturazione del trascritto primario di 4300 nt di miR-21 in pre-miR-21 di 92 nt (Figura 3). Abbastanza recentemente, è stato dimostrato che la maturazione del trascritto primario, espresso costitutivamente, è il principale meccanismo di regolazione di miR-21 in risposta al TGF- β in cellule di carcinoma della mammella e di cellule muscolari lisce della parete vascolare (VSMC: Vascular Smooth Muscle Cell) (Davis et al., 2008).

L'analisi biochimica della sequenza fiancheggiante il 5' di miR-21 ha rivelato una regione molto conservata contenente tre siti AP-1, sulla quale sono reclutati eterodimeri contenenti Fra-1 in seguito all'induzione di Ras. Saggi funzionali hanno dimostrato che il sito AP-1 al 3' è l'elemento del promotore di miR-21 che risponde maggiormente all'attivazione di Ras. Inoltre, nonostante la completa soppressione dei tre siti AP-1, si può notare un'induzione residua indipendente da AP-1 (Figure 4 e 5). Questa induzione potrebbe essere mediata dai siti ETS e STAT3, precedentemente caratterizzati sul promotore di miR-21. I due siti STAT3, localizzati subito a valle di due dei tre siti AP-1, mediano l'induzione di miR-21 da parte dell'interleuchina-6 in cellule di mieloma (Loffler et al., 2007). E' importante sottolineare che l'induzione di interleuchina-6 è coinvolta nei meccanismi della tumorigenesi indotta da Ras *in vivo* (Anrile et al., 2007). Recentemente, è stato visto in una linea cellulare promielocitica umana, che l'induzione di miR-21 da parte dell'estere del forbolo è mediata da AP-1, in cooperazione con il fattore nucleare PU.1, che lega i siti ETS adiacenti agli elementi AP-1. In particolare, è stato visto che l'induzione di miR-21, indotta dal

PMA e mediata da AP-1, causa la repressione di NFI-B, un regolatore negativo della trascrizione e nuovo target di miR-21. NFI-B reprime la trascrizione attraverso il legame ai siti ETS presenti sul promotore di miR-21 e adiacenti a due dei tre siti AP-1. La repressione di NFI-B da parte di miR-21, consente al fattore nucleare PU.1 di legarsi a sua volta ai siti ETS, e di cooperare con AP-1 per la piena trascrizione di miR-21 (Fujita et al., 2008). Questa osservazione dimostra un meccanismo di autoregolazione positivo da parte di miR-21 molto simile a quello da noi dimostrato, in cui miR-21 indotto da AP-1, causa la repressione di un suo regolatore negativo, permettendo la sua piena induzione trascrizionale.

Tra i diversi *target* di miR-21 predetti bioinformaticamente, solo altri quattro, oltre a NFI-B citato precedentemente, sono stati validati sperimentalmente. Essi codificano per proteine soppressori tumorali, e comprendono la fosfatasi PTEN nel carcinoma epatocellulare umano (Meng et al., 2007), il componente del citoscheletro tropomiosina-1 (TPM-1) in cellule del tumore della mammella (Zhu et al., 2007), il regolatore traduzionale PDCD4 nei carcinomi del colon e della mammella (Asangani et al., 2007; Frankel et al., 2007), maspin in tumore del seno (Zhu et al., 2008). Nel nostro sistema cellulare, miR-21 media, da parte di AP-1, la regolazione negativa sia di PDCD4 che di PTEN in risposta all'oncoproteina Ras (Figura 6). E' importante sottolineare che PTEN è stato descritto precedentemente come target negativo di AP-1. Infatti, l'espressione proapoptotica di PTEN è inibita da c-Jun, in fibroblasti di topo sia normali che trasformati da Ras. Di conseguenza, i livelli di PTEN e c-Jun correlano inversamente in una serie di linee cellulari tumorali. Nonostante c-Jun inibisca il promotore di PTEN, non è stata identificata nessuna regione fincheggiante il 5' di PTEN come bersaglio di c-Jun (Hettinger et al., 2007; Vasudevan et al., 2007). Nel nostro sistema, l'inibizione trascrizionale non sembra avere un ruolo principale nella repressione di PTEN, come l'effetto di Ras è completamente ridotto dall'inibizione di miR-21 (Figura 7c) che influenza PTEN a livello post-trascrizionale (Meng et al., 2007).

Per la prima volta dimostriamo che il soppressore tumorale PDCD4 è controllato negativamente da Ras. Come per PTEN, la repressione di PDCD4 da parte di Ras è prevalentemente mediata da miR-21. E' stato riportato che l'espressione di PDCD4 è controllata dall'ubiquitinazione e dalla degradazione proteosomale promosse dalla fosforilazione da parte della protein-chinasi S6K1,

durante il rientro nel ciclo cellulare (Dorrello et al., 2006). Questo meccanismo di controllo rapido non è implicato nella repressione di PDCD4 da parte di Ras, in cui la diminuzione di PDCD4 coincide con l'induzione lenta di miR-21 (Figura 3), ed è recuperata attraverso l'inibizione di miR-21 (Figura 6). A causa della sua capacità di sopprimere la trasformazione neoplastica sia *in vitro* (Yang et al., 2003b) che *in vivo* (Jansen et al., 2005), PDCD4 rappresenta un bersaglio critico di miR-21 nell'oncogenesi. La regolazione negativa di PDCD4 rappresenta la principale causa dell'effetto di miR-21 sull'invasione e sulle metastasi nel cancro del colon e della mammella, nei quali l'espressione di PDCD4 correla inversamente con quella di miR-21 (Asangani et al., 2007; Zhu et al., 2008).

In modo interessante, PDCD4 è stato caratterizzato come un potente inibitore dell'attività di AP-1. Oltre ad essere represso traduzionalmente da miR-21 (Asangani et al., 2007; Frankel et al., 2007; Zhu et al., 2008), PDCD4 stesso è un repressore traduzionale, inibendo il fattore di inizio della traduzione eIF4A (Yang et al., 2003a). PDCD4 inibisce l'attività di AP-1 e di altri fattori trascrizionali compresi β -catenina/Tcf (Wang et al., 2008) e Sp1/Sp3 (Leupold et al., 2007). PDCD4 influenza l'attività di AP-1 attraverso meccanismi indiretti, probabilmente mediati da una diminuzione della sintesi delle MAP4K1, regolando l'attività del *pathway* di JNKK/JNK/c-Jun (Bitomsky et al., 2004; Yang et al., 2006). I nostri dati suggeriscono che l'aumentata attività di AP-1 in seguito alla repressione di PDCD4 è cruciale per l'induzione dei geni target di AP-1 nella promozione tumorale. Ulteriori analisi permetteranno di identificare l'insieme di geni regolati da AP-1 dipendentemente da miR-21 e PDCD4. E' da sottolineare che, in cellule di epatocarcinoma, geni *target* canonici di AP-1, come MMP-2 e MMP-9, sono indotti da miR-21 (Meng et al., 2007), suggerendo quindi un ruolo del *pathway* miR-21/PDCD4/AP-1 nel controllo dell'invasione cellulare neoplastica. Data la regolazione del promotore di miR-21 da parte di AP-1, miR-21 potrebbe stimolare la propria trascrizione attraverso il *pathway* miR-21/PDCD4/AP-1 (Figura 9).

In uno studio recente sull'induzione del promotore di miR-21 da parte dell'estere del forbolo, è stato visto che il trascritto che codifica per il fattore trascrizionale NFI-B è un bersaglio di miR-21. Siccome NFI-B è un inibitore trascrizionale di miR-21, la repressione di NFI-B da parte di miR-21 accelera la sua degradazione dal promotore di miR-21 dopo l'induzione con PMA (Fujita et

al., 2008). Abbiamo postulato che PDCD4 e NFI-B potrebbero partecipare a meccanismi autoregolativi paralleli, favorendo l'espressione di miR-21 in contesti fisiologici e patologici. L'espressione di miR-21 indotta da AP-1 è necessaria per la vitalità delle cellule che esprimono Ras (Figura 8). Perciò, miR-21 è il primo prodotto genico non codificante che può essere aggiunto alla lista di geni regolati da AP-1, che codificano per proteine implicate nel controllo della crescita cellulare (Figura 9).

L'effetto di miR-21 sulla vitalità delle cellule di tiroide potrebbe risultare dalla sua funzione anti-apoptotica. E' importante ricordare che miR-21 è stato precedentemente caratterizzato come un fattore anti-apoptotico in cellule di glioblastoma umano (Chan et al., 2005). Di conseguenza, miR-21 sostiene la crescita cellulare mediante l'inibizione dell'apoptosi basale in cellule di carcinoma della mammella (Si et al., 2007), nelle quali l'effetto anti-proliferativo dell'inibizione di miR-21 è parzialmente recuperato dal *knockdown* di PDCD4 (Frankel et al., 2007). Inoltre, l'espressione di miR-21 è indotta da agenti citotossici, come la gemcitabina in cellule di ciolangiocarcinoma, nelle quali l'inibizione di miR-21 è capace di aumentare la sensibilità agli agenti chemioterapici (Meng et al., 2006). E' importante sottolineare che, in un modello murino di crescita di glioma, il trattamento delle cellule tumorali con l'oligo a LNA anti-miR-21 in combinazione con S-TRAIL causa la completa regressione del tumore *in vivo* (Corsten et al., 2007).

In conclusione, il nostro lavoro rivela un nuovo *pathway* che coinvolge AP-1 ed un importante onco-microRNA nella trasformazione mediata dall'oncogene Ras. Essendo allo stesso tempo controllato da AP-1 e necessario per la piena induzione dell'attività di AP-1, miR-21 è sia un bersaglio che un regolatore di AP-1 (Figura 9). Per capire l'importanza del controllo dell'espressione di miR-21 da parte di AP-1, è richiesta un'ulteriore analisi sia in tumori solidi (Volinia et al., 2006), che in leucemia linfocitica cronica, nei quali miR-21 è drasticamente iperespresso in assenza di riarrangiamenti genomici (Fulci et al., 2007). La completa comprensione dell'azione reciproca tra il controllo trascrizionale da parte di AP-1 e la regolazione post-trascrizionale mediata da miR-21, permetterà l'identificazione di nuovi *target* per un intervento terapeutico.

Materiali e Metodi

Colture cellulari e trasfezioni.

Le cellule follicolari di tiroide FRTL-5 che esprimono la proteina chimerica ER-RAS (FRTL-5^{ER-RAS}) inducibile dal 4-OH-Tamoxinene (Sigma) è stata precedentemente descritta (De Vita et al., 2005). Le cellule sono state propagate in monostrato, in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ in mezzo di cultura F12 modificato secondo Coon (Euro Clone), con aggiunta di: 5% FBS (siero fetale bovino: Gibco), streptomicina (100U/ml), penicillina (100U/ml), e una miscela di sei ormoni, comprendente: insulina (10 mg/ml), idrocortisone (10 nM), transferrina (5 mg/ml), glicil-istidil-lisina (10 ng/ml), somatostatina (10 ng/ml), tireotropina (10 mU/ml) (Sigma) come già descritto (Ambesi-Impionato et al., 1980).

Per ottenere un *pool* di cloni esprimenti i vettori pIRESpuro-GFP and pIRESpuro-GFP/A-FOS, gentilmente concessi dal Dott. Robert Hennigan (Bahassi et al., 2004), le cellule FRTL-5^{ER-RAS} sono stati trasfettate mediante lipofezione con Fugene6 (Roche) e selezionate in presenza di 3µg/ml di puromicina (Sigma).

Per ottenere l'inibizione di miR-21 e PDCD4, o l'iperespressione di miR-21, le cellule FRTL-5^{ER-RAS} sono state trasfettate, mediante l'uso di Lipofectamine 2000 (Invitrogen), con oligonucleotidi chimicamente modificati (LNA Locked Nucleic Acid; Exiqon), siRNA contro PDCD4 (Dharmacon) o il precursore di miR-21 (Ambion).

La vitalità cellulare è stata monitorata mediante un saggio di luminescenza (CellTiter-Glo, Promega) che rivela la quantità di ATP presente nelle cellule. La luminescenza è stata quantizzata attraverso l'uso di GloMax Microplate Luminometer (Promega).

Vettori e saggi reporter.

Il vettore pMIR-21-REPORT che contiene la sequenza complementare a miR-21 a valle del gene della luciferasi è stato fornito dal Dott. Anders Lund. Il vettore d'espressione pcDNA3-PDCD4 è stato donato dalla Dott.ssa Nancy Colburn.

Il frammento di 379 bp, ottenuto mediante PCR, che comprende i nucleotidi -350/+29 della regione dell'*enhancer* di miR-21 umano, è stato clonato nel vettore pGL3 promoter (Invitrogen). Il controllo positivo della transattivazione di AP-1, contenente delle sequenze TRE (7XTRE-Luc) è stato comprato dalla Stratagene. I vettori reporter derivati da pGL-4.12 (Promega) contenenti le mutazioni nei siti AP-1 del promotore di miR-21, sono stati ottenuti dal Dott. Hideo Iba. I costrutti *reporter* sono stati co-trasfettati con pIRESpuro-GFP/A-FOS, anti-mir21 LNA, o PDCD4 siRNA, assieme al controllo interno Renilla (pRL; Promega), usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Per l'induzione di Ras, 100nM di 4-OH-Tamoxifene (4-OHT) sono stati aggiunti alle cellule 14 ore dopo la trasfezione, e l'attività luciferasica è stata misurata dopo 72 ore mediante l'uso del Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) e GloMax Microplate Luminometer (Promega). In ogni diagramma, il valore dell'attività della luciferasi è rappresentato dalla media (-/+STDEV) di due o tre esperimenti indipendenti, ognuno dei quali comprende i campioni in triplicato.

Estratti proteici totali e nucleari.

Per gli estratti totali: le cellule lavate e raccolte in PBS 1X sono state risospese in una soluzione di lisi (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X100, 10% Glicerolo), a cui viene aggiunta al momento dell'uso la miscela di inibitori di proteasi e fosfatasi (Sigma). Gli omogenati sono stati incubati per 20 minuti in ghiaccio, e dopo una centrifugata a 13000 rpm per 5 a 4°C, il sopranatante è stato trasferito in nuovi tubi e conservato a -20°C.

Per gli estratti nucleari: i pellet cellulari sono stati risospesi in 10 volumi di soluzione di omogenizzazione (10 mM Hepes pH8, 10mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA), a cui viene aggiunta al momento dell'uso la miscela di inibitori di proteasi e fosfatasi (Sigma). La lisi cellulare è stata fatta meccanicamente per passaggio attraverso un ago da 26Gauge. I nuclei sono stati sedimentati per centrifugazione a 3000 rpm a 4°C, e lavati tre volte con la soluzione di omogenizzazione. Il pellet nucleare è stato risospeso in 1.2 volumi di soluzione di estrazione (10mM Hepes pH8, 0.4 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 5% Glicerolo), a cui viene aggiunta al momento dell'uso la miscela di inibitori di

proteasi e fosfatasi (Sigma). L'eluizione delle proteine nucleari è stata condotta per 30 minuti a 4°C in agitazione. Le membrane nucleari sono state sedimentate a 13000 rpm a 4°C e il sovrantante è stato immediatamente trasferito e congelato a -80°C.

Western blotting.

Dopo la determinazione della concentrazione delle proteine mediante saggio di Bradford (reagente BioRad), 30 µg d'estratti cellulari vengono sottoposti a SDS-PAGE su gel al 10%. I gel vengono quindi sottoposti a trasferimento elettroforetico su membrane di polivinil-difluoruro (PVDF, Immobilon-P, Amersham) in tampone di trasferimento (48 mM Tris-base, 3mM glicina, 10% metanolo). Successivamente i filtri sono stati incubati in "Blotto A" (0.05% Tween-20, 1X TBS, 40% latte totalmente scremato) per 30 minuti a temperatura ambiente. Gli anticorpi primari (anti c-Jun, JunB, JunD, c-Fos, Fra1, Fra2, α-Tubulina, PDCD4, PTEN (Santa Cruz Biotechnology), anti-Ras (Cell Signaling) e anti-Actina (Sigma) sono stati diluiti (generalmente 1:1000 o 1:5000) in Blotto A e incubati per un'intera notte. Dopo alcuni lavaggi in "Blotto B" (0.05% Tween-20, 1X TBS), i filtri sono stati incubati per un'ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario (coniugato alla perossidasi di rafano), diluito generalmente 1:5000 in Blotto A. Il complesso (antigene/anticorpo primario/anticorpo secondario) è stato evidenziato mediante chemiluminescenza, utilizzando il sistema di rivelazione ECL (Enhanced-Chemiluminescence) (Dura; PIERCE) e lastre autoradiografiche Kodak X-LS.

Northern blotting.

15-20 µg di RNA totali, estratti mediante Trizol (Invitrogen), sono stati separati su un gel al 15% di poliacrilammide-urea (Bio-Rad), e trasferiti mediante elettroblotting su membrana Immobilon-N+ (Millipore). Dopo il *cross-linking* dell'RNA alla membrana, mediante irradiazione agli UV, il filtro è stato ibridato con una sonda a LNA contro miR-21 (Exiqon) precedentemente marcata con ³²P al 5', in un soluzione di ibridazione ULTRAhyb-Oligo (Ambion) a 42°C per un'intera notte. La sonda (20 pmol) è stata marcata utilizzando la polinucleotide chinasi T4 (Biolabs) e 2 µCi di γ-³²P-ATP per 1 ora a 37°C. Successivamente è stata purificata

mediante l'uso di colonnine cromatografiche contenenti Sephadex G-25 (MicroSpin G-25: GE-Healthcare).

La normalizzazione è stata fatta o ibridando lo stesso filtro con una sonda diretta contro U6, o colorando il gel con bromuro d'etidio, prima del trasferimento su membrana. Il segnale è stato rilevato con l'uso del Typhoon9200 (GE-Healthcare).

Primer extension.

20 µg di RNA totali, estratti mediante Trizol (Invitrogen), sono stati retrotrascritti mediante SuperScriptII RT (Invitrogen), utilizzando una sonda complementare a una parte di miR-21 (17/22 nt del 3' del miR) e marcata come descritto precedentemente. Successivamente i campioni sono stati separati su un gel al 15% di poliacrilammide-urea (Bio-Rad). Al termine della corsa, il gel è stato disidratato mediante riscaldamento sotto vuoto (Gel Drier), e sottoposto ad autoradiografia. Il segnale è stato rilevato con l'uso del Typhoon9200 (GE-Healthcare).

Saggio dell'espressione di microRNA mediante qPCR.

Il miR-21 maturo è stato rivelato mediante l'uso del saggio d'espressione TaqMan MicroRNA (Applied Biosystems) fatto in accordo con il protocollo del produttore, e Real-Time Q-PCR ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems). L'induzione è stata calcolata usando la seguente formula:

$$\text{induzione} = 2^{-\Delta\Delta C_t}(\text{miR-21/U6})$$

dove C_t è la *threshold* del ciclo e U6 è il controllo interno. Ogni valore di C_t miR-21 è stato precedentemente normalizzato con il valore di C_t di U6. Ogni grafico rappresenta la media (-/+STDEV) di tre esperimenti indipendenti, ognuno dei quali comprende i campioni in triplicato.

EMSA.

Per ogni reazione 2µg di proteine nucleari vengono incubate in un volume finale di 20µl di soluzione contenente 20mM HEPES a pH7.5, 40mM KCl, 5% Glicerolo, 1µg Poli dI-dC, 5mM Spermidina, per 10 minuti in ghiaccio. La reazione di *binding* è stata condotta per 20 minuti a temperatura ambiente dopo l'aggiunta di circa $2 \cdot 10^4$ cpm di sonda marcata terminalmente con ^{32}P . La sonda è stata marcata e purificata come detto precedentemente.

I campioni sono stati corsi in un gel nativo (non denaturante) di poliacrilammide all'8% in TEB 0,5%. Dopo la corsa elettroretica, il gel è stato disidratato mediante riscaldamento sotto vuoto (Gel Drier), e sottoposto ad autoradiografia. Il segnale è stato rilevato con l'uso del Typhoon9200 (GE-Healthcare).

Immuno-precipitazione della cromatina (ChIP).

Circa 10^8 cellule sono state fissate con 1% formaldeide. Dopo il *cross-linking*, la cromatina è stata isolata e soggetta a sonicazione in modo da ottenere frammenti di DNA della lunghezza di 100-600bp. Dopo l'immunoprecipitazione con anticorpi specifici contro Fra-1, cJun, JunD, JunB (Santa Cruz Biotechnology) e istone-H3 acetilato (Upstate Biotech), i complessi anticorpo-DNA sono stati isolati mediante co-precipitazione con la proteina A-Sepharose (Pharmacia). Anti-IgG è stato usato come controllo negativo. Il DNA recuperato è stato quantizzato, e 50 ng di ciascun campione (*input* e immunoprecipitato) sono stati rivelati mediante PCR semiquantitativa con dei *primer* marcati radioattivamente al 5'. La marcatura dei *primer* è stata fatta allo stesso modo della marcatura delle sonde utilizzate per il Northern blotting. La quantizzazione dei frammenti di DNA della cromatina immunoprecipitata è stata fatta mediante Real Time PCR, usando la Real-Time Q-PCR ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems). L'arricchimento del DNA è stato calcolato usando la seguente formula:

$$\text{arricchimento} = 2^{-\text{DDCt}}(\text{Ab/IgG})$$

dove Ct è la *threshold* del ciclo, IgG è la normale IgG di coniglio e Ab rappresenta l'anticorpo specifico. Ogni valore di Ct della frazione di DNA

immunoprecipitata è stata precedentemente normalizzata con il valore di Ct della frazione di DNA dell'*input*. Ogni grafico rappresenta la media (-/+STDEV) di tre esperimenti indipendenti, ognuno dei quali comprende i campioni in triplicato

PCR.

2 μ g di RNA totali sono stati retrotrascritti usando la trascrittasi inversa SuperScriptII RT (Invitrogen). Un quarto del cDNA prodotto è stato usato per la PCR usando la DNA polimerasi AmpliTaq (Applied Biosystems). Come controllo interno è stato amplificato un frammento di 370 bp del gene *hpri* di ratto. Il numero di cicli di ogni PCR è stato mantenuto al minimo in modo da avere un segnale lineare. I prodotti di PCR sono stati separati in gel al 2% di agarosio.

Primers.

Per EMSA:

La sequenza TRE deriva dal promotore del gene umano della collagenasi

CollTRE: 5'-TCCGGCTGACTCATCAAGCG-3'

Per RT-PCR semi-quantitativa:

rno-mmp9

upper 5'-ACTTATGTGGTCTTCCCCCG-3'

lower 5'-ATGGTGCCACTTGAGGTCGC-3'

Lunghezza del prodotto: 279 bp

rno-ccnd1

upper 5'-GACACCAATCTCCTCAACCG-3'

lower 5'-CAGGTAGTTCATGGCCAGCG-3'

Lunghezza del prodotto: 201 bp

rno-hpri

upper 5'-CCTGCTGGATTACATTAAGCACTG-3'

lower 5'-CCTGAAGTACTCATTATAGTCAAGG-3'

Lunghezza del prodotto: 370 bp

rno-pri-miR-21

upper 5'-GCTTTGCTTTAAACCCCGCC-3'

lower 5'-TGACTGCAAACCATGATGCTG-3'

Lunghezza del prodotto: 225

Primer extension

Le basi sottolineate non complementano con miR-21
rno-miR-21 5'-GCTAGTCAACATCAGTCTGATA

Saggio di ChIP

a) RT-PCR semi-quantitativa:

upper1 (-1933)	5'-ACCAGCCTGAAGTGCTGTCT-3'
lower1 (-1698)	5'-TGTATGGTGTGGGGGATCTT-3'
upper2 (-1369)	5'-CACACGTTTTGCTGGAATTG-3'
lower2 (-1096)	5'-GGGAAGTGGAAAGGAGAAAGG-3'
upper3 (-340)	5'-GCAAACATCCATCATAAGCC-3'
lower3 (-13)	5'-GAAGTCCCACATTTATCACC-3'
upper4 (+404)	5'-CTCCACCATAGAAGCGAAGC-3'
lower4 (+609)	5'-TTACCCCATCCTTGATCCTG-3'
upper5 (+1896)	5'-TGGTCCAACCTGGAGAACCTC-3'
lower5 (+2114)	5'-AGGGTGTGCAATGCATCATA-3'

b) Real-Time PCR quantitativa:

F1qRTfor 5'-GCTGGAGTGGTGACCCATAC-3'
F1qRTrev 5'-ACAGCACTTCAGGCTGGTCT-3'
Lunghezza del prodotto: 94 bp

F3qRTfor 5'-CACACGTTTTGCTGGAATTG-3'
F3qRTrev 5'-AGGTAGTGTGGTCCCAGGTG-3'
Lunghezza del prodotto: 157 bp

F6qRTfor 5'-TTTCTGTGCAAACATCCATCA-3'
F6qRTrev 5'-AACCCCTGCGTCATCCTTAT-3'
Lunghezza del prodotto: 148 bp

F8b-for 5'-CAGGATCAAGGATGGGGTAA-3'
F8b-rev 5'-AAATCCCCAACCCAAGTTTT-3'
Lunghezza del prodotto: 123 bp

F10qRTfor 5'-TGGTCCAACCTGGAGAACCTC-3'
F10qRTrev 5'-TGATAGGCATGCAAGACTGC-3'
Lunghezza del prodotto: 151 bp

PCR del clonaggio dell' enhancer di *hsa-miR-21*:

Le basi sottolineate sono i siti di restrizione per KpnI

Upper (-350): 5'-GGGGTACCCCATGTACTGGAGTTTCTGTGC
Lower (+29): 5'- GGGGTACCCCTACTCTGGTATGGCACAAAG

Bibliografia

- Ambesi-Impiombato FS, Parks LA and Coon HG. (1980). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 3455-9.
- Ancrile B, Lim KH and Counter CM. (2007). *Genes & Development*, 21, 1714-9.
- Andersen H, Mahmood S, Tkach V, Cohn M, Kustikova O, Grigorian M, Berezin V, Bock E, Lukanidin E and Tulchinsky E. (2002). *Oncogene*, 21, 4843-8.
- Angel P, Baumann I, Stein B, Delius H, Rahmsdorf HJ and Herrlich P. (1987a). *Mol Cell Biol*, 7, 2256-66.
- Angel P, Hattori K, Smeal T and Karin M. (1988). *Cell*, 55, 875-85.
- Angel P, Imagawa M, Chiu R, Stein B, Imbra RJ, Rahmsdorf HJ, Jonat C, Herrlich P and Karin M. (1987b). *Cell*, 49, 729-39.
- Asangani I, Rasheed S, Nikolova D, Leupold J, Colburn N, Post S and Allgayer H. (2007). *Oncogene*, 9.
- Bahassi el M, Karyala S, Tomlinson CR, Sartor MA, Medvedovic M and Hennigan RF. (2004). *Clin Exp Metastasis*, 21, 293-304.
- Belguise K, Kersual N, Galtier F and Chalbos D. (2005). *Oncogene*, 24, 1434-1444.
- Bergers G, Graninger P, Braselmann S, Wrighton C and Busslinger M. (1995). *Molecular and Cellular Biology*, 15, 3748-58.
- Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, Patil CK, Campisi J and Benz CC. (2008). *Oncogene*.
- Bitomsky N, Böhm M and Klempnauer K. (2004). *Oncogene*, 23, 7484-7493.
- Bohmann D, Bos TJ, Admon A, Nishimura T, Vogt PK and Tjian R. (1987). *Science*, 238, 1386-92.
- Cai X. (2004). *RNA*, 10, 1957-1966.
- Calin G and Croce C. (2006). *Nat Rev Cancer*, 6, 857-866.
- Calin GA, Cimmino A, Fabbri M, Ferracin M, Wojcik SE, Shimizu M, Taccioli C, Zanesi N, Garzon R, Aqeilan RI, Alder H, Volinia S, Rassenti L, Liu X, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M and Croce CM. (2008). *Proc Natl Acad Sci USA*.
- Casalino L, Bakiri L, Talotta F, Weitzman J, Fusco A, Yaniv M and Verde P. (2007). *EMBO J*, 26, 1878-90.
- Casalino L, De Cesare D and Verde P. (2003). *Molecular and Cellular Biology*, 23, 4401-15.

- Chan JA, Krichevsky AM and Kosik KS. (2005). *Cancer Research*, 65, 6029-33.
- Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M and Croce C. (2005). *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 13944-9.
- Cobellis G, Missero C, Simionati B, Valle G and Di Lauro R. (2001). *Oncogene*, 20, 2281-90.
- Corsten M, Miranda R, Kasmieh R, Krichevsky A, Weissleder R and Shah K. (2007). *Cancer Research*, 67, 8994-9000.
- Davis BN, Hilyard AC, Lagna G and Hata A. (2008). *Nature*.
- De Vita G, Bauer L, da Costa VM, De Felice M, Baratta MG, De Menna M and Di Lauro R. (2005). *Mol Endocrinol*, 19, 76-89.
- Deryugina EI and Quigley JP. (2006). *Cancer Metastasis Rev*, 25, 9-34.
- Dorrello N, Peschiaroli A, Guardavaccaro D, Colburn N, Sherman N and Pagano M. (2006). *Science*, 314, 467-471.
- Eferl R, Ricci R, Kenner L, Zenz R, David JP, Rath M and Wagner E. (2003a). *Cell*, 112, 181-92.
- Eferl R and Wagner EF. (2003). *Nat Rev Cancer*, 3, 859-68.
- Elmén J, Lindow M, Schütz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, Lindholm M, Hedtjärn M, Hansen H, Berger U, Gullans S, Kearney P, Sarnow P, Straarup E and Kauppinen S. (2008). *Nature*, 452, 896-899.
- Fagin JA. (2004). *J Endocrinol*, 183, 249-56.
- Finkel MP, Biskis BO and Jinkins PB. (1966). *Science*, 151, 698-701.
- Fleischmann A, Jochum W, Eferl R, Witowsky J and Wagner EF. (2003). *Cancer Cell*, 4, 477-82.
- Foletta VC, Sonobe MH, Suzuki T, Endo T, Iba H and Cohen DR. (1994). *Oncogene*, 9, 3305-11.
- Frankel L, Christoffersen N, Jacobsen A, Lindow M, Krogh A and Lund A. (2007). *Journal of Biological Chemistry*, 283, 1026-1033.
- Fujita S and Iba H. (2008). *Bioinformatics*, 24, 303-8.
- Fujita S, Ito T, Mizutani T, Minoguchi S, Yamamichi N, Sakurai K and Iba H. (2008). *Journal of Molecular Biology*.

- Fulci V, Chiaretti S, Goldoni M, Azzalin G, Carucci N, Tavolaro S, Castellano L, Magrelli A, Citarella F, Messina M, Maggio R, Peragine N, Santangelo S, Mauro FR, Landgraf P, Tuschl T, Weir DB, Chien M, Russo JJ, Ju J, Sheridan R, Sander C, Zavolan M, Guarini A, Foà R and Macino G. (2007). *Blood*, 109, 4944-51.
- Gerdes MJ, Myakishev M, Frost NA, Rishi V, Moitra J, Acharya A, Levy MR, Park SW, Glick A, Yuspa SH and Vinson C. (2006). *Cancer Res*, 66, 7578-88.
- Grigoriadis AE, Schellander K, Wang ZQ and Wagner EF. (1993). *J Cell Biol*, 122, 685-701.
- Hanahan D and Weinberg RA. (2000). *Cell*, 100, 57-70.
- He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S, Calin G, Liu CG, Franssila K, Suster S, Kloos RT, Croce C and de la Chapelle A. (2005). *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 19075-80.
- He L, He X, Lowe S and Hannon GJ. (2007). *Nat Rev Cancer*, 7, 819-22.
- Hettinger K, Vikhanskaya F, Poh MK, Lee MK, de Belle I, Zhang JT, Reddy SA and Sabapathy K. (2007). *Cell Death Differ*, 14, 218-29.
- Iorio M. (2005). *Cancer Research*, 65, 7065-7070.
- Jansen AP, Camalier CE and Colburn NH. (2005). *Cancer Research*, 65, 6034-41.
- Jochum W, Passegue E and Wagner EF. (2001). *Oncogene*, 20, 2401-12.
- Johnson R, Spiegelman B, Hanahan D and Wisdom R. (1996). *Mol Cell Biol*, 16, 4504-11.
- Kondo T, Ezzat S and Asa S. (2006). *Nat Rev Cancer*, 6, 292-306.
- Kouzarides T and Ziff E. (1988). *Nature*, 336, 646-51.
- Kovary K, Rizzo CA, Ryseck RP, Noguchi T, Raynoschek C, Pelosin JM and Bravo R. (1991). *New Biol*, 3, 870-9.
- Landschulz WH, Johnson PF and McKnight SL. (1988). *Science*, 240, 1759-64.
- Leupold J, Yang H, Colburn N, Asangani I, Post S and Allgayer H. (2007). *Oncogene*, 26, 4550-4562.
- Lim L, Lau N, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter J, Castle J, Bartel D, Linsley P and Johnson J. (2005). *Nature*, 433, 769-773.
- Loffler D, Brocke-Heidrich K, Pfeifer G, Stocsits C, Hackermuller J, Kretschmar A, Burger R, Gramatzki M, Blumert C, Bauer K, Cvijic H, Ullmann A, Stadler P and Horn F. (2007). *Blood*, 110, 1330-1333.

- Lotterman CD, Kent OA and Mendell J. (2008). *Cell Cycle*, 7.
- Maki Y, Bos TJ, Davis C, Starbuck M and Vogt PK. (1987). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 2848-52.
- Mechta F, Lallemand D, Pfarr CM and Yaniv M. (1997). *Oncogene*, 14, 837-47.
- Meng F, Henson R, Lang M, Wehbe H, Maheshwari S, Mendell J, Jiang J, Schmittgen T and Patel T. (2006). *Gastroenterology*, 130, 2113-2129.
- Meng F, Henson R, Wehbejanek H, Ghoshal K, Jacob S and Patel T. (2007). *Gastroenterology*, 133, 647-658.
- Miller AD, Curran T and Verma IM. (1984). *Cell*, 36, 51-60.
- Nakabeppu Y, Ryder K and Nathans D. (1988). *Cell*, 55, 907-15.
- O'donnell K, Wentzel E, Zeller K, Dang C and Mendell J. (2005). *Nature*, 435, 839-843.
- Olive M, Krylov D, Echlin DR, Gardner K, Taparowsky E and Vinson C. (1997). *J Biol Chem*, 272, 18586-94.
- Pallante P. (2006). *Endocrine Related Cancer*, 13, 497-508.
- Passegue E, Jochum W, Schorpp-Kistner M, Mohle-Steinlein U and Wagner EF. (2001). *Cell*, 104, 21-32.
- Petrocca F, Visone R, Onelli MR, Shah MH, Nicoloso MS, de Martino I, Iliopoulos D, Pilozi E, Liu CG, Negrini M, Cavazzini L, Volinia S, Alder H, Ruco LP, Baldassarre G, Croce CM and Vecchione A. (2008). *Cancer Cell*, 13, 272-86.
- Pfarr CM, Mechta F, Spyrou G, Lallemand D, Carillo S and Yaniv M. (1994). *Cell*, 76, 747-60.
- Rauscher FJ, 3rd, Voulalas PJ, Franza BR, Jr. and Curran T. (1988). *Genes Dev*, 2, 1687-99.
- Riesco-Eizaguirre G and Santisteban P. (2007). *Endocr Relat Cancer*, 14, 957-77.
- Ryseck RP and Bravo R. (1991). *Oncogene*, 6, 533-42.
- Saez E, Rutberg SE, Mueller E, Oppenheim H, Smoluk J, Yuspa SH and Spiegelman BM. (1995). *Cell*, 82, 721-32.
- Sassone-Corsi P, Ransone LJ, Lamph WW and Verma IM. (1988). *Nature*, 336, 692-5.
- Schuh AC, Keating SJ, Monteclaro FS, Vogt PK and Breitman ML. (1990). *Nature*, 346, 756-60.

- Schutte J, Minna JD and Birrer MJ. (1989). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 2257-61.
- Si M, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F and Mo Y. (2007). *Oncogene*, 26, 2799-2803.
- Sidenius N and Blasi F. (2003). *Cancer Metastasis Rev*, 22, 205-22.
- Sunters A, McCluskey J and Grigoriadis AE. (1998). *Dev Genet*, 22, 386-97.
- Suzuki C, Garces RG, Edmonds KA, Hiller S, Hyberts SG, Marintchev A and Wagner G. (2008). *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 3274-9.
- Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ and Baltimore D. (2006). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 12481-6.
- Tkach V, Tulchinsky E, Lukanidin E, Vinson C, Bock E and Berezin V. (2003). *Oncogene*, 22, 5045-5054.
- Vallone D, Battista S, Pierantoni GM, Fedele M, Casalino L, Santoro M, Viglietto G, Fusco A and Verde P. (1997). *Embo J*, 16, 5310-21.
- Vasudevan K, Burikhanov R, Goswami A and Rangnekar V. (2007). *Cancer Research*, 67, 10343-10350.
- Vogt PK. (2001). *Oncogene*, 20, 2365-77.
- Volinia S, Calin G, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC and Croce C. (2006). *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 2257-61.
- Wang Q, Sun Z and Yang H. (2008). *Oncogene*, 27, 1527-1535.
- Yamamoto T, Taya S and Kaibuchi K. (1999). *J Biochem*, 126, 799-803.
- Yang HS, Jansen AP, Komar AA, Zheng X, Merrick WC, Costes S, Lockett SJ, Sonenberg N and Colburn NH. (2003a). *Molecular and Cellular Biology*, 23, 26-37.
- Yang HS, Knies JL, Stark C and Colburn NH. (2003b). *Oncogene*, 22, 3712-20.
- Yang HS, Matthews CP, Clair T, Wang Q, Baker AR, Li CC, Tan TH and Colburn NH. (2006). *Molecular and Cellular Biology*, 26, 1297-306.
- Yang YM, Bost F, Charbono W, Dean N, McKay R, Rhim JS, Depatie C and Mercola D. (2003c). *Clin Cancer Res*, 9, 391-401.
- Young MR, Li JJ, Rincon M, Flavell RA, Sathyanarayana BK, Hunziker R and Colburn N. (1999). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 9827-32.

Yu F. (2007). *Cell*, 131, 1109-1123.

Zhu S, Si M, Wu H and Mo Y. (2007). *Journal of Biological Chemistry*, 282, 14328-14336.

Zhu S, Wu H, Wu F, Nie D, Sheng S and Mo Y. (2008). *Cell Res*, 18, 350-359.