



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

DIPARTIMENTO DI BIOCHIMICA CLINICA-POLICLINICO TOR VERGATA (P.T.V)

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA

GENETICA E BIOLOGIA CELLULARE - Ciclo XXV

TITOLO TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

**RUOLO DEL SILENZIAMENTO EPIGENETICO DI miR-132 ATTRAVERSO LA METILAZIONE
DEL DNA NELLA PATOGENESI DEL CANCRO ALLA PROSTATA**

BIO/12

Coordinatore: Prof. Giorgio Prantera

Firma 

Tutor: Prof. Sergio Bernardini

Firma 



Dottoranda: Silvia Cortelli

Firma 

§ INDICE

§ INDICE DELLE FIGURE	4
§ INDICE DELLE TABELLE	5
§ GLOSSARIO	5
§ RIASSUNTO	7
§ SUMMARY	8
§ I. INTRODUZIONE	9
I.1. L'ADENOCARCINOMA PROSTATICO	9
-LA PROSTATA: Struttura, Organizzazione e Funzione	9
-IL CARCINOMA PROSTATICO	12
-EPIDEMIOLOGIA	12
-SVILUPPO E PROGRESSIONE DEL CARCINOMA PROSTATICO	12
-PATOLOGIA MOLECOLARE DELL'ADENOMA PROSTATICO	15
-REGOLATORI DEL CICLO CELLULARE E ONCOGENESI DEL CARCINOMA PROSTATICO	18
-ANOIKIS E METASTASI	21
-SCREENING DEL CARCINOMA PROSTATICO	25
-ESAMI DI LABORATORIO DIAGNOSTICI	26
-DOSAGGIO DEL PSA, STADIAZIONE E CLASSIFICAZIONE	26
-FARMACI DEMETILANTI	30
I.2. SILENZIAMENTO EPIGENETICO	33
-L'EPIGENETICA	33
-MECCANISMI DI REGOLAZIONE EPIGENETICA	34
-METILAZIONE DEL DNA	34
-MODIFICAZIONI COVALENTI DEGLI ISTONI	35
-ALTERAZIONI DELLA METILAZIONE DEL DNA NEL CANCRO	37
I.3. I microRNA	40
-I microRNA	40
-LA BIOSINTESI DEI microRNA	41
-MECCANISMO D'AZIONE E IL RUOLO MULTIFUNZIONALE DEI microRNA	44
-MicroRNA E CANCRO	46
-MicroRNA ONCOSOPPRESSORI	48
-MicroRNA ONCOGENI	51
§ II. OBIETTIVO DELLA TESI	55
§ III. MATERIALI E METODI	56
-COLTURE CELLULARI, TRATTAMENTO 5-aza-2'-deossicitidina (Decitabina) E PROFILO DI ESPRESSIONE DEI miRNA	56
-ESTRAZIONE E CONVERSIONE BISULFITICA DEL DNA GENOMICO	57
-METHYLATION SPECIFIC PCR (MSP) NELLE LINEE CELLULARI	59
-PROFILO DI ESPRESSIONE DI miR-132 IN CAMPIONI CLINICI DAL DATASET TAYLOR	61
-METHYLATION ANALYSIS ED ESTRAZIONE DELL'RNA DA 74 CAMPIONI FFPE	61
-RETROTRASCRIZIONE E REAL TIME PCR (RT-qPCR)	63
-EFFETTI BIOLOGICI DI miR-132 SULLE CELLULE PC3 (citometria a flusso, analisi della curva di crescita e della citotossicità)	63
-IMMUNOBLOTTING	64
-LUCIFERASI ASSAY E COSTRUTTI	64
-DATABASE BIOINFORMATICI	65
§ IV. RISULTATI	66
-SCREENING DEI miRNAs EPIGENETICAMENTE SILENZIATI NEL PCa	66

-L'ESPRESSIONE DI miR-132 E LA METILAZIONE DELLE CpG ISLANDS E' CORRELATA CON VARIABILI CLINICHE E PATOLOGICHE.....	78
-miR-132 EVOCA LA MORTE CELLULARE TRAMITE L'ANOIKIS.....	83
-HB-EGF E TALIN2 SONO I TARGET DIRETTI DI miR-132	86
§ V. DISCUSSIONE.....	91
-IL TRATTAMENTO CON AZA DELLE CELLULE PCa RIVELA UNA CERTA QUANTITA' DI DATI INFORMATIVI	91
-LA METILAZIONE CANCRO-SPECIFICA DEI miRNA NELLE LINEE CELLULARI DI PCa	93
-CORRELAZIONE DELLA METILAZIONE DEI miRNA NELLE LINEE CELLULARI DI PCa CON I CASI DI PAZIENTI AFFETTI DA PCa	94
-RILEVANZA CLINICA DELL'ESPRESSIONE E DELLA METILAZIONE DI miR-132.....	95
-IL RUOLO BIOLOGICO DELLA FUNZIONE DI miR-132 NELLE CELLULE PC3.....	97
§ V. CONCLUSIONE	99
§ VI. BIBLIOGRAFIA	100
§ VII. PUBBLICAZIONI	122
§ VIII. PROGRAMMI DI RICERCA NAZIONALI E INTERNAZIONALI.....	123
§ IX. PARTECIPAZIONI A CONGRESSI (ABSTRACT)	124
§ X. RINGRAZIAMENTI.....	128

§ INDICE DELLE FIGURE

Figura 1. Anatomia della prostata.....	9
Figura 2. Anatomia della prostata: Le tre zone anatomiche	10
Figura 3. Anatomia della prostata: Tessuto Epiteliale Prostatico	10
Figura 4. Organizzazione Istologica della ghiandola prostatica.	11
Figura 5. Stadi evolutivi di un carcinoma prostatico	13
Figura 6. Le vie di trasduzione del segnale del recettore degli androgeni nello sviluppo del cancro della prostata.	14
Figura 7. <i>Pathway</i> Molecolare nello sviluppo del cancro della prostata	17
Figura 8. La regolazione del ciclo cellulare.	19
Figura 9. Modello di tumorigenesi.....	22
Figura 10. <i>Pathway</i> di sopravvivenza Adesione –mediato ECM-integrina.....	23
Figura 11. Modello del <i>Pathway</i> estrinseco ed intrinseco dell’apoptosi.....	24
Figura 12. Il <i>Pathway</i> estrinseco dell’apoptosi	25
Figura 13. Dosaggio del PSA.....	27
Figura 14. Diagnosi istologica di Cancro della Prostata con i gradi di Gleason associati.....	28
Figura 15. Struttura dell’Azacitidina e della Decitabina.....	31
Figura 16. Sintesi della Decitabina	32
Figura 17. Alterazioni della metilazione nel cancro.	39
Figura 18. La biogenesi dei microRNA	42
Figura 19. Struttura dell’RNasi di tipoIII Dicer.....	43
Figura 20. Struttura delle proteine Argonauta	44
Figura 21. I microRNA oncosoppressori e oncogeni.....	48
Figura 22. Schematica rappresentazione dei miR coinvolti nel cancro della prostata.....	50
Figura 23. <i>Target</i> del <i>pathway</i> apoptotico nel cancro della prostata.	54
Figura 24. La conversione bisulfidica delle citosine non-metilate ad uracile.....	58
Figura 25. Schema di Lavoro: <i>screening</i> miRNA.....	66
Figura 26. Identificazione dei miRNA metilati nelle linee cellulari di PCa trattate con il farmaco 5-aza-2’-deossicitidina (AZA) usando il <i>miRNAome megaplex stemloop RT-qPCR</i>	76
Figura 27. L’espressione del miR-132 è correlata con variabili cliniche in 111 campioni di cancro della prostata (Taylor dataset).....	78
Figura 28. Analisi di espressione e metilazione del miR-132 in 50 campioni di cancro FFPE.....	80
Figura 29. Validità dell’espressione di miR-132 nelle linee cellulari PC3.....	82
Figura 30. Analisi del ciclo cellulare delle linee cellulari PC3 trasfettate con le sequenze <i>scrambled</i> o premiR-132 a 72h.....	83
Figura 31. L’espressione successiva di miR-132 nelle cellule PC3 induce il distacco seguito dalla morte cellulare.....	85
Figura 32. HB-EGF e TALIN2 <i>target</i> del miR-132 nelle cellule PC3.	89

§ INDICE DELLE TABELLE

Tabella 1. Classificazione e stadiazione del tumore della prostata tramite il sistema TNM.	30
Tabella 2. Sequenze di <i>Primers</i> usate in questo studio.....	60
Tabella 3. Incidenza del Tumore Prostatico nei pazienti analizzati.....	62
Tabella 4. MiRNA con un'aumentata espressione (≥ 2 fold) dopo trattamento con 5-aza-2' deossicitidina nelle linee cellulari prostatiche.	67
Tabella 5. Selezione e screening di candidati miRNA nelle linee cellulari tramite <i>Megaplex</i> <i>stemloop RT-PreAMP-qPCR</i> : miRNA upregulati dall'AZA ≥ 2 fold nelle linee tumorali ed aventi <i>CpG island</i> entro 10kb a monte del loro <i>TSS</i>	71
Tabella 6. 38 miRNAs selezionati per l'analisi della metilazione tramite MSP nelle linee cellulari prostatiche (tumorali e normali).....	74
Tabella 7. Correlazione tra l'espressione del miR-132 con il <i>KEGG-pathway signature</i>	87

§ GLOSSARIO

Anoikis	Il distacco delle cellule dalla matrice extracellulare seguita dalla morte cellulare
AR	Recettore degli androgeni
AZA	5-aza-2'-deoxycytidine
BH3	<i>Bcl-2 homology 3</i>
BIC	<i>B-cell integration cluster</i>
CDKs	Chinasi ciclina-dipendenti
CGH	Ibridazione genomica comparativa
CKI	Inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti
CLL	Leucemia linfocitica cronica delle cellule B
Ctrl	Controllo
CZ	Regione centrale della ghiandola prostatica
DNMTs	DNA metiltransferasi
ECM	Matrice extracellulare
EGF	Fattore di crescita epidermico
Exp5	RAN-GTPasi Esportina 5
FISH	Ibridazione <i>in situ</i> per fluorescenza
Fluoresceina DA	Fluoresceina diacetato
FFPE	Tessuti fissati in formalina e paraffina
FRA	Regioni comuni di rottura e Siti fragili dei cromosomi
Fw	Primer forward
GSTP1	Glutatione-S-transferasi
HATs	Istone acetiltransferasi
HB-EGF	<i>Heparin-binding epidermal growth factor</i>
HDACs	Istone-deacetilasi
HDMs	Istone demetiltransferasi
HPV	Papilloma virus umano

HSO₃⁻	Ione sodico bisolfito
IGF-1	Fattore di crescita dell' insulina simile
CpG islands/ Isole CpG	Aggregati di regioni ricche in GC che precedono molti geni trascritti di vertebrati
LCM	<i>Laser-capture microdissection</i>
LDH	Lattato deidrogenasi
LOH	<i>Loss of heterozigosity</i>
LOI	Perdita dell'imprinting
M	Primers Metilati
5me	5-metilcitosina
microRNA/miRNA	Una classe di RNA non codificanti coinvolti nella regolazione dell'espressione genica
mRNA	RNA messaggeri
MSP	<i>Methylation specific PCR</i>
N	Tessuto normale
ncRNAs	<i>small non-coding RNAs</i>
NA	<i>Not available</i>
NE	Cellule neuroendocrine
PCa	Carcinoma della prostata
PCA3	<i>Prostate gene3</i>
PET-CT Colina	<i>Positron Emission Tomography- computed tomography</i>
PI	Ioduro di propidio
PI3-K	Fosfoinositol 3 chinasi B
PIA	Atrofia infiammatoria prostatica
PIN	Lesione intraepiteliale
PolII	RNA polimerasi II
PSA	<i>Prostate specific antigen</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homologue</i>
PZ	Regione periferica della ghiandola prostatica
Rb	Oncosoppressore retinoblastoma
RISC	<i>RNA induced-silencing complex</i>
Rv	Primer reverse
RU	Unità relative
SAM	S-adenosil-L-metionina
SIRT1	Sirtuina istone deacetilasi di classe III
SnoRNA	<i>small nucleolar RNA</i>
T	Tumorale
TNM	Tumore primario, metastasi linfo-nodale e metastasi ad altri organi
TRAIL-R	Recettore di morte cellulare
TRUS	<i>Transrectal Ultrasound Sonography</i>
TZ	Regione di transizione della ghiandola prostatica
U	Primers Non Metilati
3'UTR	Regioni non tradotte al 3'

§ RIASSUNTO

L'Epigenetica è lo studio dei meccanismi responsabili di cambiamenti ereditabili nelle funzioni del genoma senza alcuna modificazione nella sequenza del DNA. Parte dell'epigenoma è coinvolto nella metilazione delle citosine in regioni ricche di dinucleotidi CpG chiamate “*isole CpG*” oppure “*CpG islands*”. Le *isole CpG* sono localizzate nel promotore e la loro metilazione inibisce la trascrizione genica a valle.

Nelle cellule tumorali la metilazione aberrante del promotore determina la diminuzione dell'espressione endogena di una piccola classe di RNA chiamati microRNA (o miRNA). I microRNA inibiscono la traduzione dell'mRNA per regolare il *network* cellulare. Nel cancro alla prostata, la diminuzione dell'espressione dei microRNA potrebbe contribuire all'inizio e allo sviluppo del cancro, e la causa potrebbe essere l'ipermetilazione del loro promotore.

Per analizzare il ruolo del silenziamento epigenetico dei microRNA attraverso la metilazione del DNA nel cancro alla prostata, le cellule normali (PrEC) e tumorali (PC3, DU145 e LNCaP) sono state trattate con il farmaco demetilante 5-aza-2'-deoxycytidine (AZA), inseguito sono stati determinati i cambiamenti d'espressione di 650 miRNA usando la *megaplex stemloop RT-qPCR*.

Dopo aver applicato un'accurata selezione è stato analizzato il *pattern* di metilazione delle *isole CpG* a monte di un *set* di microRNA tramite la *methylation specific PCR* (MSP). Le *isole CpG* di miR-18b, miR-132, miR-34b/c, miR-148a, miR-450a and miR-542-3p mostrano un *pattern* di metilazione congruente con la loro variazione di espressione in risposta all'AZA.

L'analisi di metilazione di queste *isole CpG* in un pannello di 50 campioni umani di cancro alla prostata e 24 campioni di controllo normali hanno mostrato che miR-132 è metilato nel 42% dei tessuti umani di cancro in modo positivamente correlato al *Gleason score* e alla stadiazione patologica.

L'analisi di espressione di miR-132 nel nostro pannello di tessuti ha confermato la sua diminuzione di espressione tramite la metilazione nel tumore. La ri-espressione di miR-132 nelle cellule PC3 ha indotto il distacco delle cellule dalla matrice extracellulare seguita dalla morte cellulare (*anoikis*).

Due proteine coinvolte nell'adesione cellulare [heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) e Talin2] sono state confermate come *target* diretti di miR-132.

Questi risultati dimostrano che miR-132 è un microRNA la cui diminuzione di espressione è correlata con la metilazione ed ha un ruolo anti-metastatico nel cancro alla prostata controllando l'adesione cellulare. Inoltre, l'espressione di miR-132 o la metilazione delle *isole CpG* può essere utilizzato come un biomarcatore per la progressione del tumore prostatico e come potenziale strategia terapeutica per il tumore della prostata ad uno stadio avanzato.

§ SUMMARY

Epigenetic refers to heritable changes in gene expression not involving the DNA sequence. Part of the epigenome involves the methylation of cytosine in regions rich of CpG dinucleotides called “*CpG islands*”.

The *CpG islands* are placed at the promoter regions and their methylation silenced the downstream gene transcription.

In cancer aberrant promoter methylation has begun to explain the deregulated expression of small, endogenous RNAs called microRNA (or miRNA). MicroRNAs inhibit mRNA translation to fine tune gene network. In prostate cancer, the downregulation of microRNAs may contribute to cancer initiation and development, and the cause may be their promoter hypermethylation.

To screen for epigenetically silenced miRNAs in prostate cancer, prostate normal epithelial (PrEC) and carcinoma cells (PC3, DU145 and LNCaP) were treated with the demethylation agent 5-aza-2'-deoxycytidine (AZA) and subsequently examined the expression changes of 650 miRNAs using megaplex stemloop RT-qPCR.

After applying a selection strategy it was analyzed the methylation status of CpG islands upstream a subset of miRNAs by methylation specific PCR (MSP). The CpG islands of miR-18b, miR-132, miR-34b/c, miR-148a, miR-450a and miR-542-3p exhibited methylation patterns congruent with their expression modulations in response to AZA.

Methylation analysis of these CpG islands in a panel of 50 human prostate carcinoma specimens and 24 normal controls revealed miR-132 to be methylated in 42% of human cancer cases in a positively manner correlated to total Gleason and tumor stage.

Expression analysis of miR-132 in our tissue panel confirmed its downregulation through methylation in tumor. Re-expression of miR-132 in PC3 cells induced cell detachment followed by cell death (*anoikis*).

Two proteins involved in cellular adhesion [heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) and Talin2] were confirmed as direct targets of miR-132.

These results demonstrate that miR-132 is a methylation-silenced miRNA with an antimetastatic role in prostate cancer controlling cellular adhesion, furthermore taking into account the use of miR-132 expression or CpG island methylation as a biomarker for PCa progression and its potential therapeutic strategy for advanced PCa.

§ I. INTRODUZIONE

I.1. L'ADENOCARCINOMA PROSTATICO

LA PROSTATA: Struttura, Organizzazione e Funzione

La prostata è una ghiandola tubulo-alveolare che si trova sotto la vescica e davanti al retto, circondando il collo della vescica e l'uretra nella quale secerne parte del fluido che trasporta gli spermatozoi durante l'eiaculazione (Fig.1).

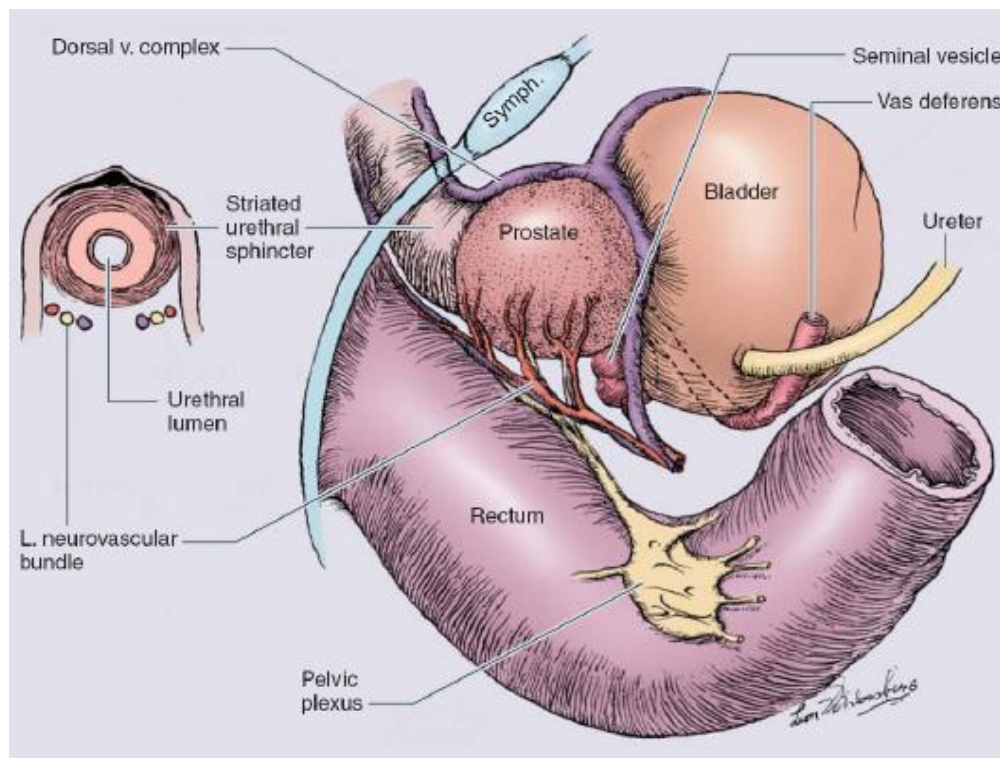


Figura 1. Anatomia della prostata. Copyright© 2004, 2000, 1995 by Elsevier Inc.

La ghiandola prostatica viene divisa in tre zone biologicamente e anatomicamente distinte: la regione periferica (PZ), la centrale (CZ) e quella di transizione (TZ). (Fig.2)

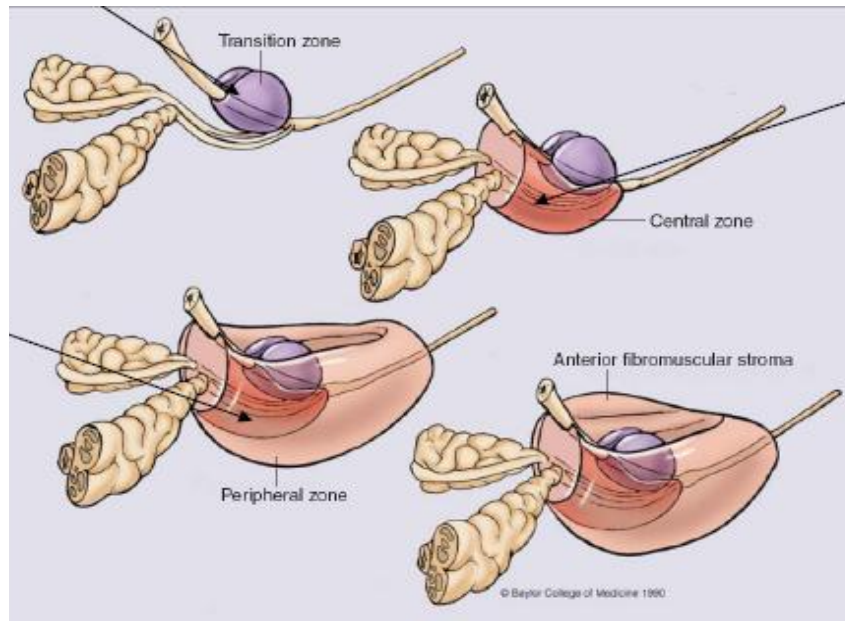


Figura 2. Anatomia della prostata: Le tre zone anatomiche Copyright© 2004, 2000, 1995 by Elsevier Inc.

Ciascuna di queste zone è formata da una serie di dotti ed acini ghiandolari rivestiti da cellule epiteliali. L'epitelio ghiandolare prostatico è diviso in due strati: lo strato basale, vicino alla membrana basale, e lo strato luminale costituito da cellule secretorie colonnari alte con nuclei basali (Fig.3).

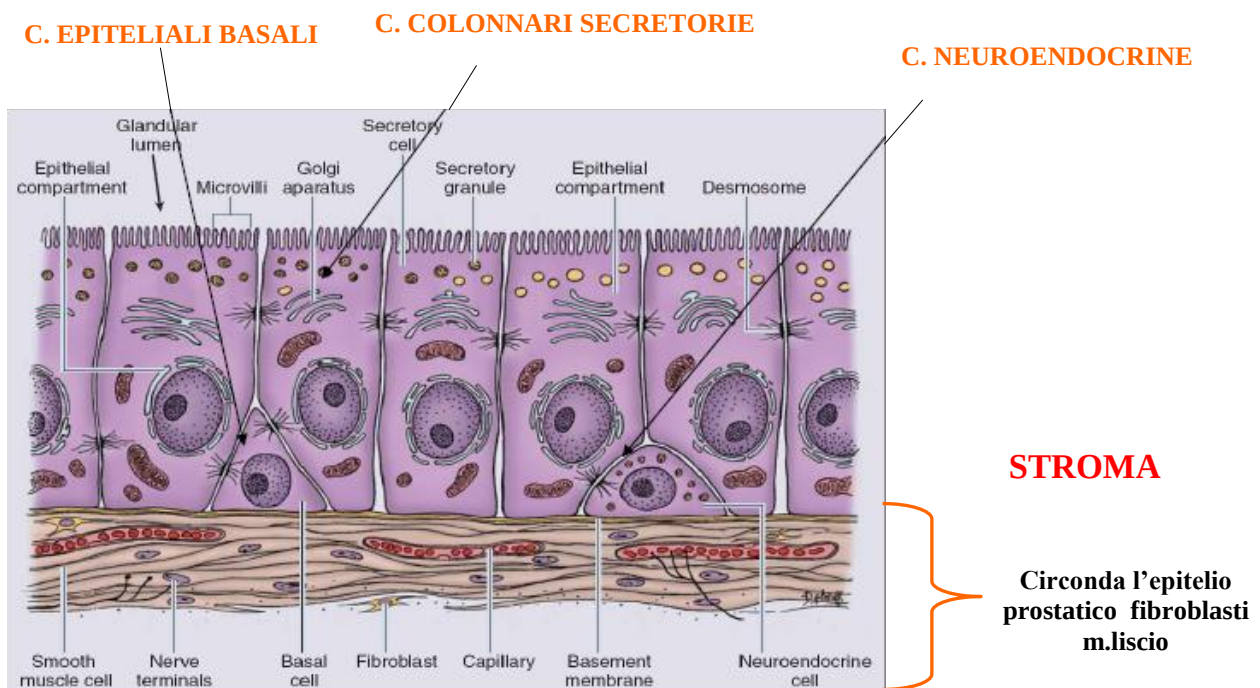


Figura 3. Anatomia della prostata: Tessuto Epiteliale Prostatico. Copyright© 2004, 2000, 1995 by Elsevier Inc.

Nello strato basale sono presenti le cellule staminali costituenti il compartimento proliferativo dell'epitelio prostatico; queste cellule androgeno-indipendenti danno origine ad un tipo cellulare intermedio, le cellule di transizione pluripotenti e androgeno-responsive, che generano le cellule secretorie differenziate e probabilmente anche le cellule neuroendocrine (Isaacs and Copffey, 1989).

Le cellule luminali, derivate da quelle di transizione, esprimono il recettore degli androgeni (AR) e sono dipendenti dalla stimolazione ormonale per la loro vitalità e attività secretoria; in assenza degli androgeni esse vanno incontro ad apoptosi (Isaacs, 1999).

L'epitelio ghiandolare è circondato da una membrana basale che lo separa dallo stroma fibromuscolare contenente cellule muscolari AR-positive, fibroblasti, nervi, linfociti, e macrofagi infiltrati ed una rete vascolare capillare (Fig. 4).

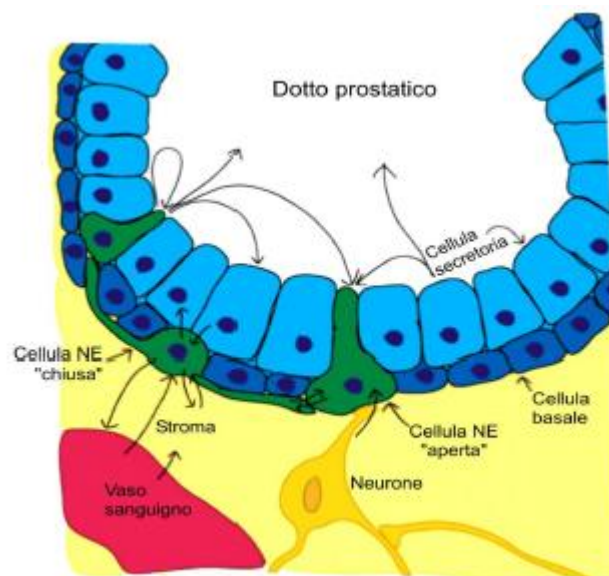


Figura 4. Organizzazione Istologica della ghiandola prostatica.

Sono mostrate le cellule epiteliali dello strato basale e dello strato secretorio, le cellule neuroendocrine (NE) e la componente stromale all'interno del quale si trovano terminazioni neuronali e vasi sanguigni. Si noti che non vi sono vasi all'interno del compartimento epiteliale.

IL CARCINOMA PROSTATICO

EPIDEMIOLOGIA

Il carcinoma della prostata (PCa) è nel mondo occidentale la più frequente neoplasia maschile e rappresenta la seconda causa di morte per neoplasia dopo il tumore del polmone (Cookson, 2001).

Le cause principali dello sviluppo del cancro prostatico sono probabilmente riconducibili a fattori ambientali e genetici. Il tumore della prostata è tipicamente una malattia degli uomini di età superiore ai 50 anni, essendo il 75% della diagnosi associato ad individui con età superiore ai 65 anni (Breslow *et al.*, 1977). Esiste anche una ben nota correlazione fra l'incidenza di tale neoplasia e differenze etniche e geografiche (Albani *et al.*, 2009). Il cancro della prostata, molto raro nella popolazione asiatica il cui tasso di mortalità è pari alla metà rispetto a quello dei caucasici, risulta essere al contrario molto frequente nella popolazione afro-americana. Tra i fattori di rischio probabilmente coinvolti nello sviluppo del carcinoma prostatico possono essere annoverati: obesità, peso corporeo, diete ricche di grassi, fumo di sigaretta, livelli elevati di androgeni, ridotto apporto di vitamina E, vitamina D e selenio, agenti infettivi trasmessi sessualmente e alterazioni genetiche.

SVILUPPO E PROGRESSIONE DEL CARCINOMA PROSTATICO

Sebbene sia chiaro che il carcinoma della prostata origini dal compartimento epiteliale, l'identificazione dello specifico sottotipo cellulare (androgeno dipendente, sensibile o indipendente) da cui origina il carcinoma non è ancora chiaro. Il modello tutt'oggi accettato è che in una delle popolazioni epiteliali (cellule staminali basali, cellule di transizione o cellule luminali) una cellula perda il controllo del proprio tasso di crescita originando un clone in attiva divisione che forma una lesione intraepiteliale (PIN).

L'atrofia infiammatoria prostatica (PIA) viene considerata uno stadio precursore del PIN essendo solitamente osservata nella regione periferica della ghiandola prostatica in cui hanno origine la maggior parte dei carcinomi prostatici, e presenta un'instabilità cromosomica molto simile a quella osservata nel PIN e nelle cellule di carcinoma prostatico (Nelson *et al.*, 2003).

Con l'accumulo di alterazioni sempre maggiori, il PIN può accrescersi fino a trasformarsi in un vero e proprio adenocarcinoma prostatico.

Negli stadi iniziali il tumore prostatico è confinato alla ghiandola, ed essendo generalmente caratterizzato da cellule a crescita molto lenta (Berges *et al.*, 1995) può restare asintomatico e non

diagnosticato per anni. Successivamente, l'acquisita capacità migratoria delle cellule tumorali consente la loro diffusione anche in altre parti del corpo, portando alla formazione di metastasi soprattutto a livello linfonodale ed osseo (Fig.5).

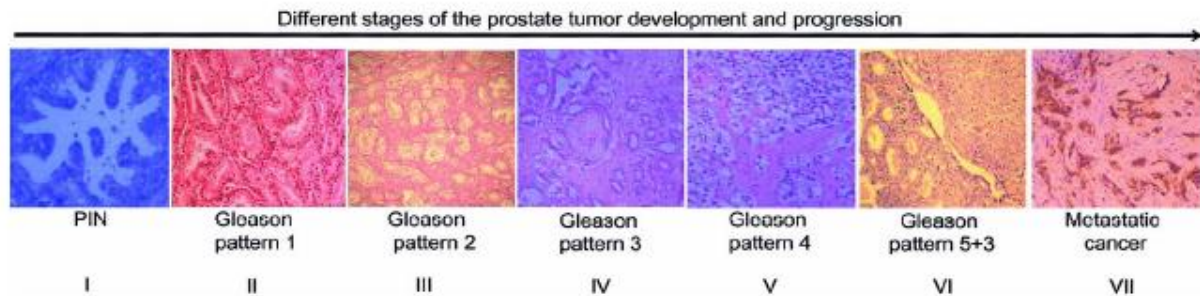


Figura 5. Stadi evolutivi di un carcinoma prostatico.

Pannello I: lesione intraepiteliale (PIN) di alto grado. Dal pannello II al pannello VI sono mostrati tumori differenziati con grado di malignità (Gleason pattern) sempre più elevato; si noti che con il progredire del tumore si perde sempre di più la distinzione tra i dotti e si osserva una fusione delle strutture ghiandolari. Pannello VII: carcinoma prostatico con metastasi alle ossa. (Le sezioni istologiche sono colorate con ematossilina-eosina).

La caratteristica principale dello sviluppo del carcinoma prostatico è rappresentata dalla progressione dello stadio iniziale di crescita dipendente dagli androgeni (androgeno-dipendenza) a quello avanzato, irreversibile, di refrattarietà ormonale (androgeno-indipendenza).

Sebbene negli ultimi anni la ricerca abbia impiegato un notevole sforzo nel tentativo di individuare le basi genetiche coinvolte in questo tipo di transizione, il meccanismo molecolare rimane ancora scarsamente conosciuto. Il recettore degli androgeni (AR) riveste sicuramente un ruolo fondamentale nella progressione del carcinoma prostatico, essendo la sua attivazione essenziale per le fasi iniziali della crescita tumorale. Infatti la terapia ormonale basata sulla deprivazione dagli androgeni attraverso castrazione chirurgica o chimica produce una sensibile regressione del tumore causata dall'induzione dell'apoptosi nelle cellule ormone-responsive (Scott *et al.*, 1980; Denmeade *et al.*, 1996; Denmeade and Isaacs, 1996).

Sfortunatamente, però, la terapia ormonale diventa inefficace e la regressione del tumore quindi solo transiente, quando, inevitabilmente, le cellule neoplastiche iniziano a dividersi in modo indipendente dall'azione degli androgeni. Numerose evidenze suggeriscono un ruolo determinante del recettore degli androgeni anche durante lo stadio di androgeno-indipendenza. Questa teoria è supportata dal fatto che l'inespressione e l'inattivazione di tali recettori sono state riscontrate nella maggior parte dei carcinomi androgeno-indipendenti. Inoltre, a carico di questi stessi recettori

risultano essere presenti una serie di alterazioni raramente osservate nei tumori androgeno-dipendenti.

Questi cambiamenti che comprendono mutazioni puntiformi e variazioni nell'espressione di proteine coregolatrici, convergono verso l'identificazione di un recettore degli androgeni che è in grado di rispondere sia a basse concentrazioni di androgeni che ad un gran numero di ligandi agonisti (Taplin and Balk, 2004).

Sembra inoltre evidente che in questo stadio avanzato i recettori degli androgeni possano essere attivati in maniera ligando-indipendente da fattori di crescita o citochine come ad esempio *il fattore di crescita dell' insulina simile* (IGF-1), *il fattore di crescita epidermico* (EGF) e le interleuchine 1 e 6 (Taplin and Balk, 2004; Ueda *et al.*, 2002; Lattouf *et al.*, 2006a) (Fig.6).

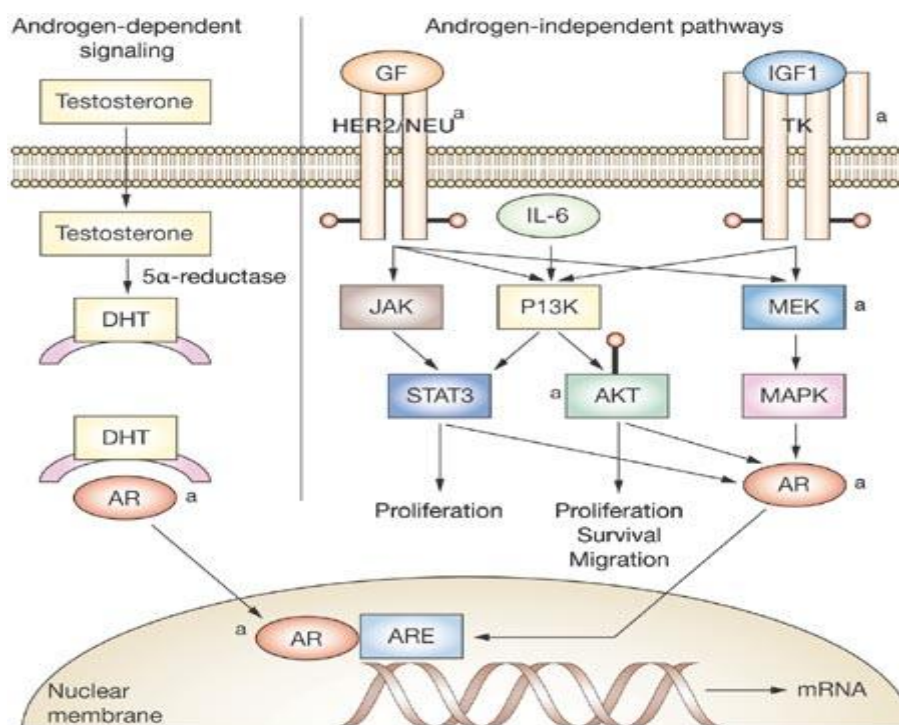


Figura 6. Le vie di trasduzione del segnale del recettore degli androgeni nello sviluppo del cancro della prostata.
(Lattouf *et al.*, 2006a *Nature Clinical Practice Urology*).

L'insorgere di tutte queste alterazioni a carico dei recettori degli androgeni produce da parte delle cellule tumorali una risposta in termini di crescita alternativa o dipendente dagli androgeni, rendendo la terapia ormonale inefficace.

La conseguenza naturale al fallimento di tale terapia viene rappresentata dalla prostatectomia radicale con le sue ovvie ripercussioni a livello psicologico sul paziente.

In ambito scientifico è quindi cresciuta l'attenzione verso alternative terapeutiche che consentono di debellare il tumore con complicazioni ed effetti collaterali minori (Lattouf *et al.*, 2006b).

Esistono almeno tre possibili approcci per cercare di bloccare la crescita delle cellule tumorali a prescindere dalla loro dipendenza dagli androgeni.

Il primo è stimolare il sistema immunitario dell'ospite ad indurre una risposta citotossica antitumorale (Morris and Scher, 2002); il secondo è bloccare farmacologicamente le vie di trasduzione del segnale intracellulare al fine di inibire la sintesi del DNA e quindi il ciclo cellulare delle cellule neoplastiche (si veda la completa *review* di Morris and Scher, 2000); il terzo approccio è bloccare la neo-angiogenesi tumorale, ossia la formazione dei nuovi vasi sanguigni a partire da vasi pre-esistenti, necessaria allo sviluppo di tutti i tumori solidi tra cui anche il tumore della prostata (Jimenez *et al.*, 2006).

PATOLOGIA MOLECOLARE DELL'ADENOMA PROSTATICO

Come è stato precedentemente accennato, tra i fattori di rischio per la progressione del tumore prostatico spicca una gran varietà di alterazioni genetiche che, associata alla componente epigenetica ed ambientale, fornisce le basi essenziali per lo sviluppo di tale neoplasia.

L'individuazione dei polimorfismi genetici associati a questa malattia potrebbe rappresentare un passo importante nella comprensione dei *pathway* molecolari coinvolti nel processo di carcinogenesi della prostata, ed allo stesso tempo gettare le basi per lo sviluppo futuro di nuove applicazioni cliniche.

Sebbene nella ricerca biomolecolare la recente diffusione di nuove metodologie scientifiche (come la tecnica del *microarray* o le applicazioni di *proteomica*) abbia contribuito enormemente alla comprensione della funzione di proteine coinvolte nella biologia tumorale, risulta ancora molto difficile individuare e classificare quelle alterazioni genetiche che caratterizzano in maniera specifica il carcinoma prostatico.

Questo sembra essere in parte dovuto alla marcata eterogeneità e alla natura multifocale di questa specifica neoplasia (Konishi *et al.*, 2005).

Morfologicamente, infatti, il carcinoma della prostata presenta non solo una sensibile eterogeneità del grado istologico nei singoli tumori, ma anche un'istogenesi multifocale dello stesso organo prostatico.

In alcuni casi questa eterogeneità potrebbe essere il risultato di una tumorigenesi multifocale originata da tumori multifocali di vario grado, che con il passare del tempo si fondono a formare una lesione unica (Konishi *et al.*, 2005).

Per questo motivo è anche molto complicato distinguere a livello molecolare le forme di carcinoma ereditarie da quelle sporadiche.

Il numero dei *loci* genetici coinvolti nella carcinogenesi prostatica sembra essere molto ampio. Approcci citogenetici di *ibridazione in situ per fluorescenza* (FISH) o di *ibridazione genomica comparativa* (CGH) hanno rivelato una serie consistente di anomalie cromosomiche che alterano l'inespressione di geni correlati con la progressione e lo sviluppo del tumore.

Limitate sono le informazioni relative al coinvolgimento di oncogeni nel carcinoma prostatico; fra questi spiccano c-myc, ras, c-ErbB-2, Bcl-2.

L'inespressione del noto attivatore trascrizionale c-myc è stata correlata con il grado di Gleason del tumore, mentre quella della proteina antiapoptotica Bcl-2 è presente in circa metà dei tumori ed in particolare in quelli androgeno-indipendenti e metastatici (McDonnel *et al.*, 1992).

Al contrario, sembrano essere molto numerose le evidenze sul coinvolgimento di oncosoppressori, il cui prodotto genico può essere alterato da mutazioni, delezioni, riarrangiamenti, ipermetilazione dei promotori e aploinsufficienze.

Infatti, una delle più comuni alterazioni genetiche di questa patologia riguarda proprio un oncosoppressore, il gene per la glutatione-S-transferasi (GSTP1), la cui inattivazione causata dall'ipermetilazione del suo promotore, è stata riscontrata in più del 90% dei casi (Millar *et al.*, 1999; Bernardini *et al.*, 2004).

Anche in altri geni, le mutazioni germinali predispongono allo sviluppo della neoplasia; questi geni sono: RNASEL (HCP1) localizzazione 1q25 e MSR1 localizzazione 8p22, definiti come geni di suscettibilità (Cybulsky *et al.*, 2007; Beuten *et al.*, 2010).

La mancanza di espressione di PTEN (*Phosphatase and tensin homologue*) in linee cellulari di carcinoma della prostata (Vlietstra *et al.*, 1998) risulta essere spesso frequente anche nei carcinomi associati a stadi di sviluppo avanzati (Suzuki *et al.*, 1998; Vivanco *et al.*, 2002).

Il gene per PTEN codifica per una fosfatasi che agisce da regolatore negativo della via di trasduzione del segnale della fosfoinositol 3 chinasi B (PI3-K Akt) essenziale per la progressione del ciclo cellulare e per il mantenimento della sopravvivenza cellulare (Sun *et al.*, 1999; Jose *et al.*, 2004). (Fig.7).

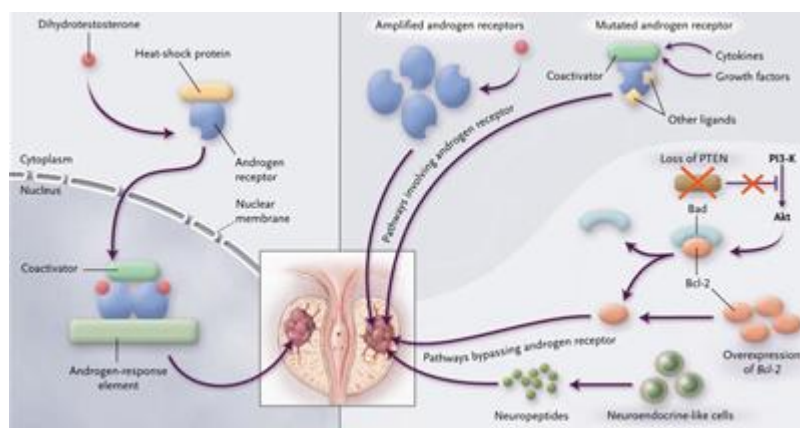


Figura 7. Pathway Molecolare nello sviluppo del cancro della prostata. (Jose *et al.*, 2004 *N.Engl.J.Med.*).

La perdita del braccio corto del cromosoma 8, che sembra essere un evento precoce della neoplasia prostatica, causa la scomparsa dell'oncosoppressore NKX3.1.

Questa proteina, essenziale per il normale sviluppo dell'organo prostatico, assume un notevole interesse perché è in grado di legarsi al DNA ed aumentare l'espressione del gene PSA (*prostate specific antigen*) (Chen *et al.*, 2002). La sua perdita, dunque, potrebbe essere coinvolta nell'incremento della concentrazione del PSA osservata nella progressione del tumore della prostata.

Sebbene la letteratura presenti risultati contrastanti, sembrerebbe che anche il gene per l'oncosoppressore retinoblastoma (Rb), la cui deregolazione è stata associata con un'ampia varietà di carcinomi umani, possa giocare un ruolo importante nella carcinogenesi della prostata; infatti è stato recentemente dimostrato che in modelli di topi la sua inattivazione causa un incremento del tasso proliferativi dell'epitelio prostatico con un fenotipo assimilabile a quello della neoplasia intraepiteliale prostatica (PIN) (Hill *et al.*, 2005; Maddison *et al.*, 2004).

E' ormai noto che le mutazioni a carico di p53, il più famoso degli oncosoppressori, siano rare nei carcinomi primari, ma molto comuni nei tumori di alto grado associati a stadi avanzati dello sviluppo come per esempio all'androgeno-indipendenza o alle metastasi ossee (Bookstein *et al.*, 1993; Dinjens *et al.*, 1994).

REGOLATORI DEL CICLO CELLULARE E ONCOGENESI DEL CARCINOMA PROSTATICO

Un ruolo chiave nella patogenesi prostatica è svolto dall'interazione di proteine coinvolte nel ciclo cellulare, soprattutto di quelle deputate alla regolazione dell'azione delle chinasi ciclina-dipendenti (CDKs). Queste ultime sono una famiglia di serin/treonin-chinasi che, fosforilando specifiche proteine nucleari, assumono un ruolo centrale nel controllo ordinato della progressione tra le varie fasi del ciclo cellulare (Pestell *et al.*, 1999).

La loro attività viene regolata mediante fosforilazione causata dall'interazione con subunità regolatorie positive, meglio conosciute come cicline (Pestell *et al.*, 1999; Sherr *et al.*, 1996), o in maniera negativa con gli inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti (CKI) (Sherr *et al.*, 1999) (Fig.8).

E' stato osservato il coinvolgimento di alcune cicline nella progressione del carcinoma prostatico.

Per esempio, la ciclina di tipo D, coinvolta nella transizione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare è stata associata a tumori derivati da metastasi ossee (Drobnjak *et al.*, 2000) e la sua overespressione aumenta la crescita e la tumorigenicità della linea cellulare androgeno-dipendente derivata da metastasi linfonodale LNCaP (Chen *et al.*, 1998).

Recenti evidenze supportano anche il fatto che l'innalzamento dei livelli della ciclina D1 causi, mediante inibizione di CDK6, la sottoespressione del recettore degli androgeni e possa essere dunque responsabile della resistenza alla terapia androgeno ablativa (Petre-Draviam *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2005).

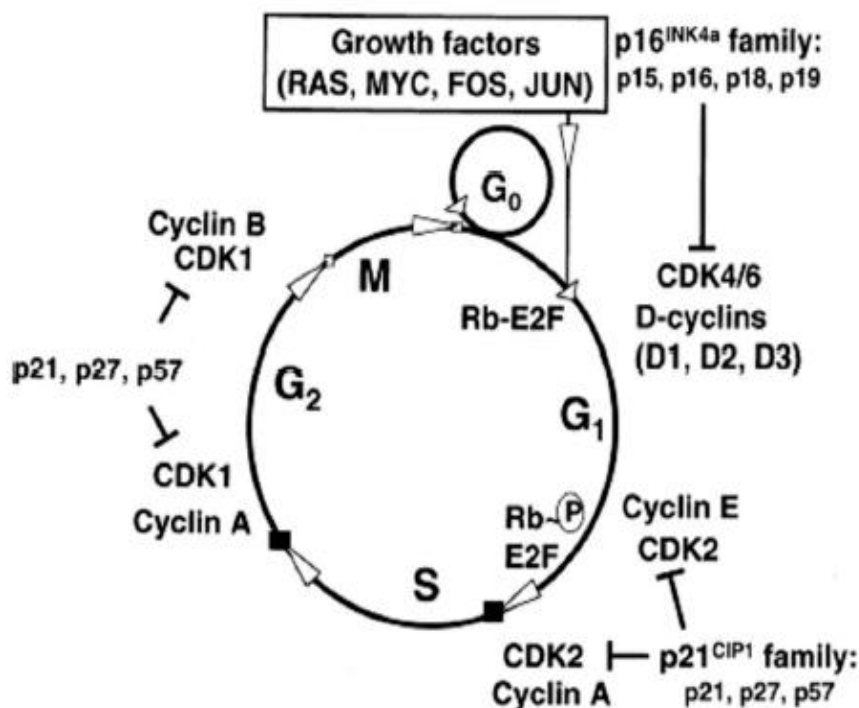


Figura 8. La regolazione del ciclo cellulare.

Per la progressione controllata nelle varie fasi del ciclo cellulare è richiesta un'associazione coordinata fra le specifiche cicline e le chinasi ciclina-dipendenti: il complesso ciclina D-CDK4/6 agisce nella fase G₁, ciclina E-CDK2 e ciclina A-CDK2 nella transizione tra G₁ e la fase S, mentre ciclina A o B-CDK1 in quella G₂/M (Sherr *et al.*, 1996; Del Sal *et al.*, 1996).

Anche alcune alterazioni a livello degli inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti (CKI) sono state spesso associate con la neoplasia prostatica. Fra queste spiccano le mutazioni del gene CDKN2 (p16), riscontrate frequentemente in tumori metastatici (Jarrad *et al.*, 1997; Gu *et al.*, 1998), e quelle osservate in p21 (Gao *et al.*, 1995), la cui espressione potrebbe essere coinvolta nella comparsa di recidive (Aaltomaa *et al.*, 1999); tuttavia le più interessanti nello studio della biologia tumorale risultano essere quelle correlate all'espressione del gene CDKN1B, che codifica per p27 Kip1.

Quest'ultimo esercita la sua azione molecolare inibendo l'attività dei complessi delle chinasi ciclina-dipendenti e con le cicline E ed A, regolando così negativamente la transizione dalla fase G₁ alla fase S del ciclo cellulare (Tsihlias *et al.*, 1998).

I livelli di p27, normalmente abbondanti nelle cellule quiescenti, subiscono una rapida diminuzione a seguito di stimoli fitogeni, causando l'entrata nella fase S del ciclo cellulare.

Questa caratteristica conferisce a p27 un ruolo determinante nella regolazione della proliferazione cellulare (Kiyokawa *et al.*, 1996), del differenziamento (Casaccia-Boneff *et al.*, 1997) e della trasformazione maligna (Nakayama *et al.*, 1996).

Infatti, una diminuzione dei suoi livelli di espressione, che risulta in una perdita del normale tasso di crescita cellulare, è stata riscontrata in molti tipi di tumori, quali ad esempio quello della mammella, quello gastrico, polmonare, esofageo e coloretale (Sgambato *et al.*, 2000; Kawamata *et al.*, 1995; Slingerland and Pagano, 2000) rendendolo nella maggior parte dei casi un indicatore di prognosi infausta.

La riduzione dei livelli di p27 è stata più volte associata alla neoplasia della prostata come ad esempio nell'iperplasia prostatica benigna, nella neoplasia intraepiteliale prostatica e nel carcinoma prostatico conclamato (Yang *et al.*, 1998), ed è stata correlata con il fallimento della terapia antiormonale, con un elevato grado del punteggio di Gleason e con uno stadio aggressivo di metastatizzazione (Yang *et al.*, 1998; Lloyd *et al.*, 1999).

Tutte queste evidenze hanno suggerito un possibile ruolo di p27 come marcatore molecolare di cancro prostatico maligno (Tsihlias *et al.*, 1999).

Le mutazioni a carico del gene p27 sono però molto rare: ci sono scarse evidenze sulla perdita di espressione per delezione della regione cromosomiale 12p12-3 su cui il gene stesso mappa, ma è invece ormai accertato che la regolazione dei suoi livelli di espressione sia principalmente dovuta all'azione di meccanismi *post-trascrizionali* (Loda *et al.*, 1997).

Fra questi, fino ad oggi, il più caratterizzato risulta essere quello della degradazione mediata dal proteasoma, che è fortemente acceso in molti tipi di cancro (Alkarain *et al.*, 2004) per opera dell'inattivazione oncogenica di vari recettori tirosin-chinasici e di vie di trasduzione del segnale.

La proteolisi di p27 sembra comprendere due meccanismi d'azione temporalmente coordinati fra loro, che agiscono insieme nel promuovere la scomparsa di p27 richiesta per l'entrata in fase S del ciclo cellulare (Alkarain *et al.*, 2004). Il primo dei due inizia ad agire in risposta a stimoli mitogeni nelle fasi iniziali di G1, causando, tramite fosforilazione di un residuo serinico specifico (Ser10) di p27, la degradazione mediata dall'esportazione della proteina stessa nel citoplasma (Bohem *et al.*, 2002).

Di conseguenza, il risultante abbassamento dei livelli intranucleari di p27 causa un ovvio incremento di attivazione del complesso E-CDK2. Quest'ultimo a sua volta agisce nella fase tardiva di G1 ed in S, fosforilando lo specifico residuo treoninico 187 di p27, permettendone il riconoscimento da parte del complesso multifattoriale SCF che media l'ubiquitinazione e la degradazione da parte del proteasoma 26S (Sheaff *et al.*, 1997; Vlach *et al.*, 1997; Pagano *et al.*, 1995; Ganoth *et al.*, 2001).

ANOIKIS E METASTASI

La comunità scientifica in questi anni ha investito notevoli risorse a favore del progresso della ricerca oncologica trovando cure giuste per il cancro attraverso strumenti d'avanguardia.

Nella lotta contro il cancro si cominciano a raccogliere i primi frutti, grazie alla campagna di prevenzione e l'introduzione di cure più efficaci anche da un punto di vista farmacologico: ad oggi sono stati identificati centinaia di oncogeni e soppressori tumorali con un profilo di espressione cancro-specifico. Tuttavia trattamenti attraverso singole molecole *target* (*target therapy*) fanno fronte ad un sofisticato *background* di processi aberranti inerenti ad un complicato ed ingegnoso *network* cellulare con l'attivazione di *pathway* di sopravvivenza che evolvono di anno in anno.

La Figura 9 illustra il processo di tumorigenesi. Le caratteristiche fenotipiche di una cellula tumorale differiscono in molti aspetti da una cellula normale, ed ogni aspetto ha un proprio meccanismo legato a diverse molecole che subiscono cambiamenti di espressione coinvolti nella sopravvivenza tumorale. In confronto ad una cellula normale, la cellula tumorale ha una migliore capacità di migrazione, di proliferazione, di produrre metastasi e pertanto elevata efficienza di invasione e di sopravvivenza.

Le cellule metastatiche evadono da un certo tipo di morte cellulare presente in tutte le cellule del tessuto solido innescato dal distacco dalla loro matrice, chiamato *anoikis*.

Il 90% delle morti dovute a tumore è il risultato di metastasi dove le cellule tumorali si distaccano dal loro sito di origine e crescono in una gamma prevedibile di organi bersaglio dipendente dall'organo cui il tumore inizialmente si è sviluppato (Cooper and Pienta, 2000; Weigelt *et al.*, 2005; Yilmaz and Christofori, 2009).

Il processo include molti passaggi come la degradazione della matrice extracellulare, migrazione cellulare, ancoraggio-indipendente dalla crescita, evasione dal processo apoptotico, angiogenesi, invasione dei tessuti circostanti, adesione cellulare, movimento e colonizzazione di siti distanti (Sakamoto and Kyprianou, 2010).

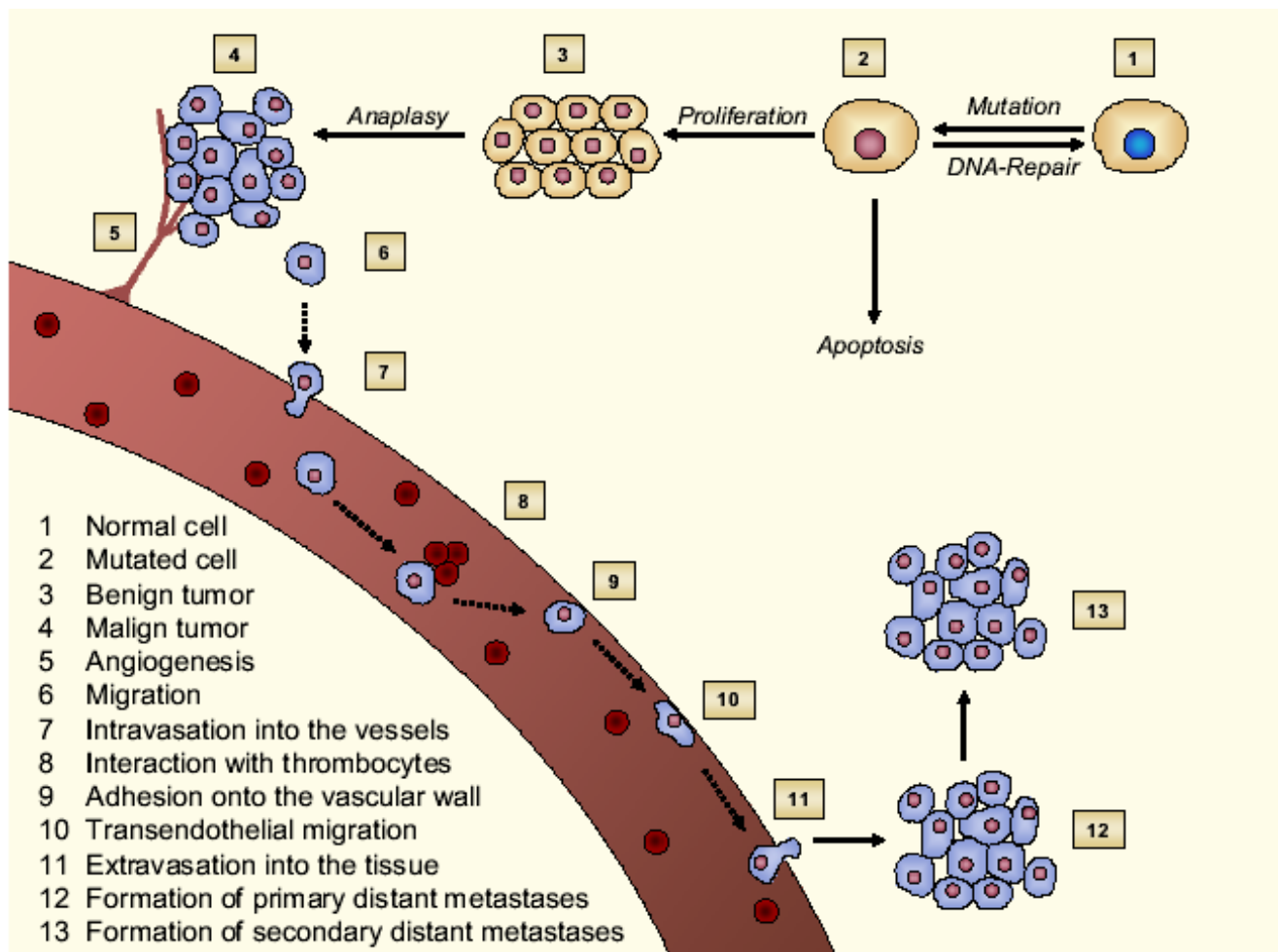


Figura 9. Modello di tumorigenesi. Freimuth *et al.*, 2009.

Anoikis è una parola di derivazione greca coniata da Frisch e Francis in un articolo pubblicato nel *Journal of Cell Biology* nel 1994 (Frisch and Francis, 1994) che significa letteralmente lo stato di “essere senza casa” per descrivere la risposta apoptotica delle cellule causata dall’assenza di interazioni cellula-matrice. E’ una forma di morte cellulare programmata che è indotta da cellule ancoraggio-dipendenti con conseguente distacco dalla matrice extracellulare (ECM). Di solito le cellule stanno vicino al tessuto a cui appartengono in quanto la comunicazione tra le cellule prossimali, come pure tra cellule ed ECM fornisce segnali essenziali per la crescita o la sopravvivenza. Le cellule tumorali possono controllare i *pathways anoikis*-dipendenti come il *pathway* estrinseco ed il *pathway* di sopravvivenza cellulare ECM-integrina (Frisch and Rouslahti, 1997; Frisch and Screaton, 2001; Sakamoto and Kyprianou, 2010).

In un microambiente sano, le cellule epiteliali si distaccano dalla loro matrice e vanno incontro ad *anoikis*, ma la loro omeostasi è inalterata (Frisch and Francis, 1994).

La Figura 10 mostra l'attivazione del *pathway* di sopravvivenza cellulare adesione-dipendente mediato dall'interazione dell'integrina con l'ECM e la conseguente attivazione di Talin1, FAK/SRC e ILK-1.

L'attivazione di ILK-1 determina la fosforilazione di GSK3 β , il reclutamento di Snail e l'attivazione di segnali di sopravvivenza cellulare tramite PI3K/AKT. La perdita dei segnali di sopravvivenza causata dal distacco sensibilizza le cellule all'apoptosi.

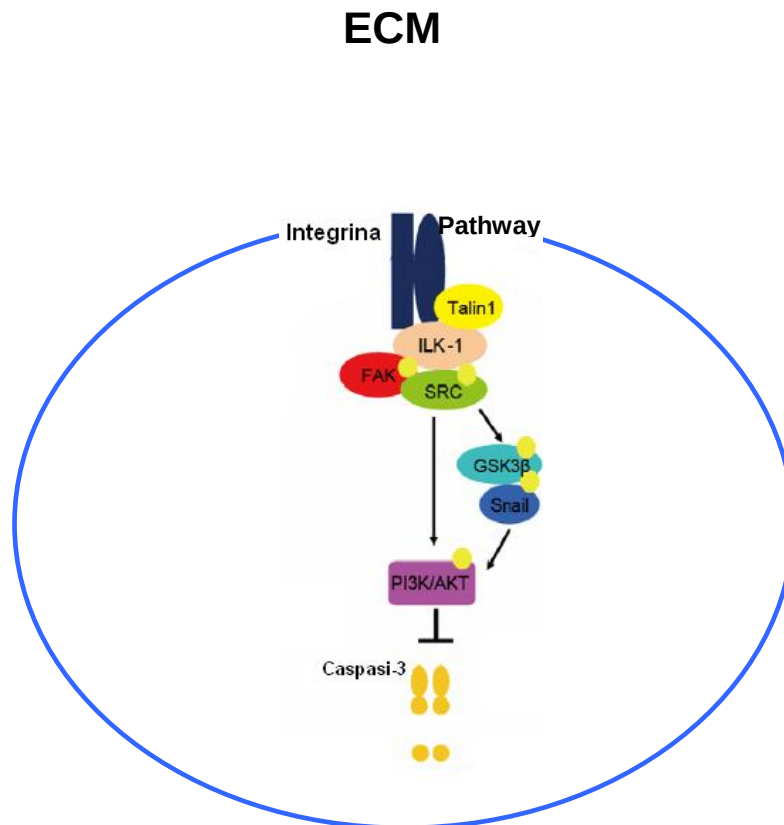


Figura 10. Pathway di sopravvivenza Adesione –mediato ECM-integrina.

Ricreato da Sakamoto e Kyprianou, 2010.

Il distacco cellulare come lo stimolo di morte rappresenta l'unico aspetto dell' *anoikis*, in quanto il conseguente meccanismo di morte risulta da una comune apoptosi, in molti casi dal *pathway* estrinseco di morte (Pellegrini and Stasser, 2000; Sakamoto and Kyprianou, 2010).

La Figura 11 semplifica i due *pathway* di apoptosi, mentre la Figura 12 illustra il *pathway* estrinseco in grande dettaglio. Nel *pathway* intrinseco, alcuni stimoli come il danno del DNA, la mancanza di fattori di crescita o fattori di stress cellulare attivano p53 oppure le proteine pro-apoptotiche *Bcl-2* *homology* 3 (BH3), provocando così la permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna ed il rilascio del citocromo c e Smac (Ziegler *et al.*, 2008).

In seguito, la Caspasi 9 si attiva, a cui segue l'attivazione dell'effettore delle caspasi 3 e 7 dando il segnale per l'apoptosi. Nel *pathway* estrinseco, l'attivazione diretta del recettore di morte cellulare (TRAIL-R) attraverso i ligandi come FAS, TRAIL e TNF determinano il reclutamento delle proteine FADD e TRADD, l'attivazione della caspasi 8 e/o caspasi 10, dell'effettore della caspasi, a cui segue la morte cellulare (Pellegrini and Stasser, 2000; Ziegler *et al.*, 2008; Sakamoto and Kyprianou, 2010).

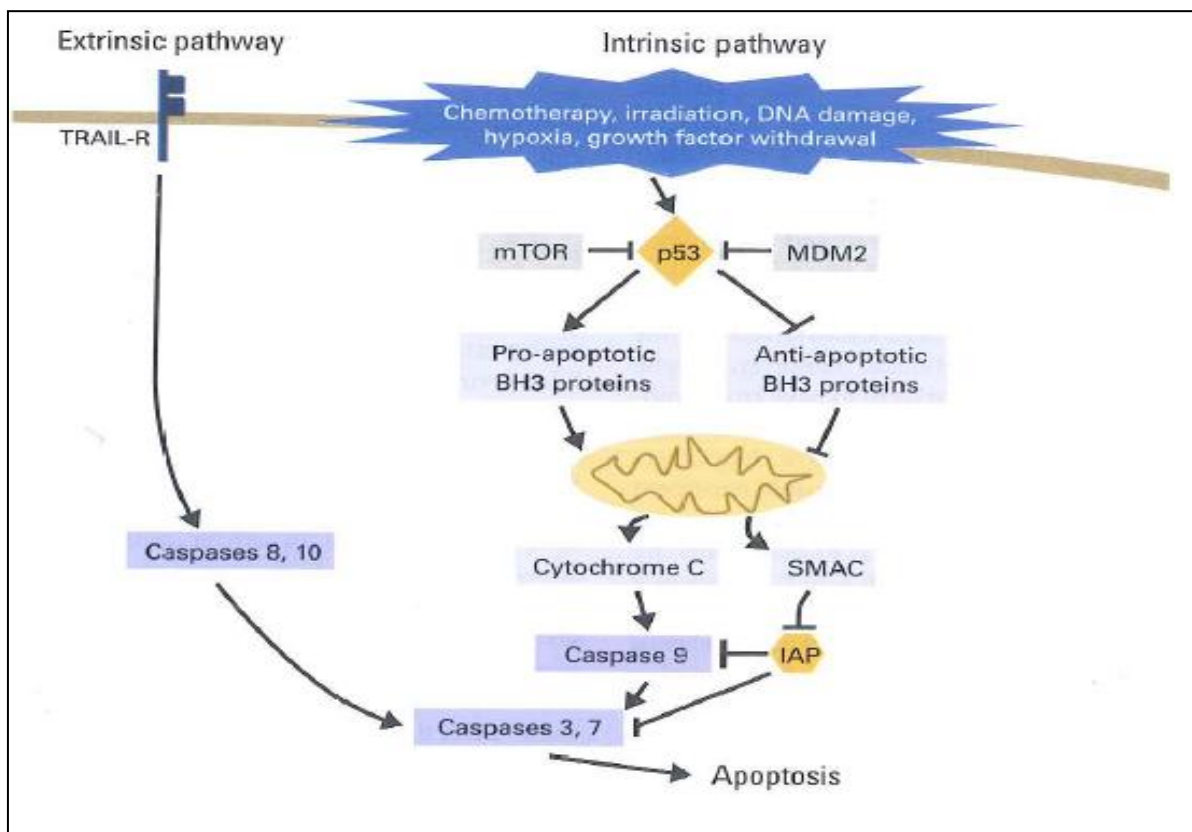


Figura 11. Modello del Pathway estrinseco ed intrinseco dell'apoptosi. Ziegler *et al.*, 2008

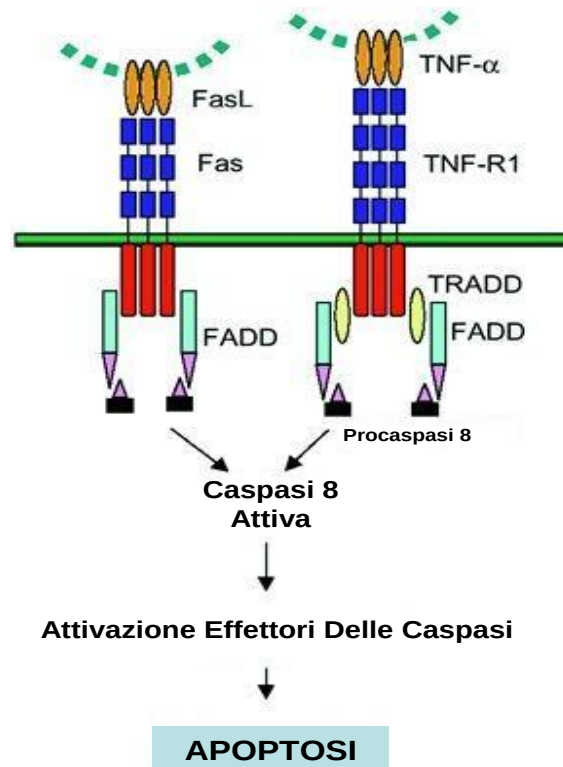


Figura 12. Il Pathway estrinseco dell'apoptosi. Ricreato da Pellegrini and Strasser, 2000.

SCREENING DEL CARCINOMA PROSTATICO

Il carcinoma della prostata insorge solitamente (80%) nella parte periferica della ghiandola, dando così ragione della scarsa incidenza di disturbi minzionali, anche quando la neoplasia raggiunge volumi importanti. Al contrario, l'iperplasia prostatica benigna si sviluppa nella zona di transizione della ghiandola (McNeal, 1978) e quindi si accompagna a tutta una serie di sintomi causati dall'ostruzione uretrale, come esitazione minzionale, nicturia, incompleto svuotamento della vescica, mitto ipovalido. Tali sintomi sono raramente causati dal carcinoma, e in tal caso la loro presenza è indice di cattiva prognosi.

In altri casi il tumore dà segno di sé solo quando ormai ha dato origine a metastasi, più frequentemente all'osso, che si accompagnano nella maggior parte dei casi a dolore osseo e astenia.

I metodi di *screening* oggi utilizzati sono:

- Esame Rettale
- Dosaggio del PSA
- La TRUS (*Transrectal Ultrasound Sonography*) e la PET-CT Colina (*Positron Emission Tomography- computed tomography*) per identificare eventuali metastasi osee
- Conferma Diagnostica tramite Biopsia della stadiazione

ESAMI DI LABORATORIO DIAGNOSTICI

DOSAGGIO DEL PSA, STADIAZIONE E CLASSIFICAZIONE

Il PSA è una glicoproteina con attività serino-proteasica, presente nel citoplasma delle cellule epiteliali prostatiche, sia normali sia maligne la cui funzione è di fluidificare il liquido seminale nel momento dell'eiaculazione.

I suoi livelli possono essere facilmente dosati con metodo radioimmunologico: essi rispecchiano fedelmente l'attività della ghiandola prostatica. Possiamo quindi affermare che il PSA è un *marker* organo specifico, ma non tumore specifico, poiché può risultare alterato anche in caso di prostatiti, IPB e manipolazione sull'organo.

E' però importante valutare il livello dell'aumento: solitamente un valore superiore a 10ng/ml è fortemente suggestivo di neoplasia.

Ponendo il *cutpoint* del PSA a 4ng/ml si ottiene una sensibilità dell'86% ed una specificità dell'38% (Hoffman *et al.*, 2002), il che significa che solo una persona su tre, tra i pazienti risultati positivi, sarà realmente affetta da tumore prostatico.

E' quindi da considerare la presenza di un elevato numero di falsi positivi, che può portare a rischio di overdiagnosi (Etzioni *et al.*, 2002) e ad un eccessivo ricorso alla biopsia, che rimane tuttavia un punto fondamentale nel percorso diagnostico, non esistendo ancora un *marker* ideale per il tumore prostatico.

Per aumentare la sensibilità del PSA si può affiancare al dosaggio totale la valutazione del PSA "*free*", ovvero della quota di glicoproteina non legata, che aumenta maggiormente nelle lesioni benigne piuttosto che nel cancro, e del *PSA ratio* ($PSA\ free/PSA\ tot$) (Montironi *et al.*, 2000).

In recenti studi si ipotizza di introdurre anche il dosaggio della percentuale di pro-PSA, che ha dimostrato di essere il più potente *marker* del tumore prostatico anche a bassi livelli, particolarmente tra 2 e 4 ng/ml (Otto *et al.*, 2004).

L'aumento dei valori di PSA oltre un livello di 4ng/ml è correlato con un rischio crescente di neoplasia; valori di PSA tra 4 e 10ng/ml indicano un sospetto di tumore della prostata, ma occorre considerare l'esistenza di una possibile iperplasia. Livelli di PSA superiori a 10 ng/ml sono correlati con un rischio ancora più alto di neoplasia, anche in assenza di parametri critici di sospetto.

L'incidenza dei tumori in soggetti con PSA inferiori a 4ng/ml è del 2% contro il 70% di quelli con PSA superiore a 10ng/ml.

Il rischio di tumore prostatico si può quantificare nel modo seguente (Fig.13)

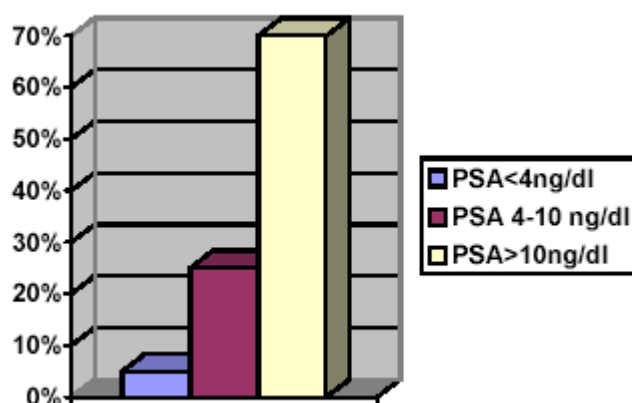


Figura 13. Dosaggio del PSA

Oggi è possibile dosare un ulteriore *marker* per il carcinoma prostatico, il PCA3 (*prostate gene3*); l'iperespressione di questo gene (valutabile mediante dosaggio dell'mRNA nelle urine) è strettamente associata alla trasformazione maligna delle cellule della prostata. Il dosaggio è quindi particolarmente utile nei pazienti già sottoposti a biopsia, per predire l'evoluzione del tumore (Hessels *et al.*, 2009; Laxman *et al.*, 2008; de la Taille *et al.*, 2007; Bussemakers *et al.*, 1999; Neves *et al.*, 2008; Haese *et al.*, 2008; Marks *et al.*, 2007).

La diagnosi di carcinoma prostatico necessita della valutazione istologica della lesione, attraverso prelievo bioptico (manovra diagnostica obbligatoria) in caso di elevazione del PSA sierico non altrimenti spiegabile di esplorazione rettale sospetta, di riscontro di aree ipoecogene all'ecografia prostatica transrettale o di una combinazione di questi elementi). Se la diagnosi è confermata il patologo assegna un grado Gleason per ogni sezione istologica analizzata (O'Dowd *et al.*, 2001). La Figura 14 illustra l'architettura del grado di Gleason. Un elevato grado corrisponde ad una grande perdita della normale struttura tissutale in quella specifica sezione.

Il sistema di classificazione secondo Gleason valuta l'architettura (*pattern*) del carcinoma prostatico.

Sono identificati sia il *pattern* principale (predominante) sia il secondario (secondo più comune); poi viene attribuito un punteggio da 1 a 5 indicando con 1 l'aspetto più differenziato e con 5 quello meno differenziato. Se un tumore ha solo un *pattern* istologico allora ai patterns primari e secondari è assegnato lo stesso numero.

Il grado primario rappresenta la maggioranza del tumore che deve essere superiore al 50% del *pattern* osservato. Il grado secondario si riferisce invece alla minoranza del tumore che deve essere inferiore al 50%, ma almeno il 5% del totale *pattern* osservato.

La somma dei due *pattern* rappresenta il Gleason score. Questo valore numerico ha un *range* 2-10.

Un Gleason score di 7 o sopra identifica un alto grado tumorale con uno scarso differenziamento.

Sempre più spesso i patologi forniscono una componente "terziaria". Questa viene assegnata dove è presente una componente di un terzo *pattern*, generalmente più aggressivo.



Figura 14. Diagnosi istologica di Cancro della Prostata con i gradi di Gleason associati.
National Cancer Institute, 2011.

Il materiale biotico offre la possibilità di assegnare un *Gleason score*, ma non uno stadio tumorale. Lo stadio descrive quanto il cancro si è diffuso dentro la prostata, la sua grandezza e se ha formato metastasi (Palo Alto Medical Foundation, 2011). La determinazione dei due tipi di stadi- clinico e patologico- dipende per prima cosa dal quadro clinico della malattia (basata su DRE, test di

laboratorio, materiale biptico e test di *imaging*) e in secondo luogo il giudizio di un patologo di tutta la prostata dopo la rimozione chirurgica dell'organo (prostatectomia radicale).

L'assegnazione dello stadio dipende dal sistema TNM, dove le lettere T, N e M si riferiscono al tumore primario, metastasi linfo-nodale e metastasi ad altri organi, rispettivamente. La tabella 1 tratta in dettaglio il sistema per entrambi gli stadi clinico e patologico.

L'aggiunta di metodi sopra descritti per lo *screening*, la diagnosi e la predizione della prognosi ha migliorato le prospettive cliniche per i pazienti con PCa. Comunque, queste tecniche hanno problemi nell'accuratezza e sensibilità. I loro svantaggi richiedono pertanto una ricerca approfondita di nuovi biomarcatori per la diagnosi del carcinoma prostatico.

T stages		N stages		M stages
Clinico	Patologico	Clinico	Patologico	Clinico
TX-- Il tumore primario non può essere valutato T0--Nessuna evidenza di tumore primario T1-- Il tumore non può essere individuato con i test di imaging T1a-Meno del 5% della prostata è affetta da tumore T1b-Più del 5% della prostata è affetta da tumore T1c- Il tumore è identificato attraverso biopsia, elevato PSA T2--Tumore confinato all'interno della prostata T2a- Il tumore colpisce la metà di un lobo o meno T2b- Il tumore colpisce della metà di un lobo ma non entrambi T2c- Il tumore colpisce entrambi i lobi T3-- Il tumore si estende attraverso la capsula della prostata T3a- Il tumore si estende oltre la capsula della prostata T3b- Il tumore invade le vescicole seminali T4-- Il tumore si è stabilizzato oppure invade le aree circostanti, come il collo della vescica, lo sfintere esterno, il retto, i muscoli levatori, e/o la parete pelvica.	pT2 -- Il tumore è limitato nella prostata pT2a -- Il tumore colpisce la metà di un lobo o meno pT2b -- Il tumore colpisce più della metà di un lobo ma non entrambi i lobi pT2c --Il tumore colpisce entrambi i lobi pT3--Il tumore si estende oltre la prostata pT3a--Il tumore si estende oltre la prostata pT3b--Il tumore invade le vescicole seminali pT4-- Il tumore invade il collo, il retto	NX -- I linfonodi locali non sono stimati N0--Il tumore non si è esteso nei linfonodi locali N1--Il tumore ha invaso i linfonodi locali	pNX--I linfonodi locali non sono stimati pN0--I linfonodi locali non sono affetti da tumore pN1--I linfonodi locali sono affetti da tumore	MX -- Non sono stimate metastasi distali M0--Non sono presenti metastasi distali M1a--I linfonodi locali non sono affetti da tumore M1b--Le ossa sono affette da tumore M1c-- Altri siti sono affetti da tumore con o senza malattia dell'osso

Tabella 1. Classificazione e stadiazione del tumore della prostata tramite il sistema TNM.
Palo Alto Medical Foundation, 2011.

FARMACI DEMETILANTI

Le modificazioni epigenetiche sono eventi potenzialmente reversibili che determinano riarrangiamenti cromatinici trasmissibili da una cellula alla sua progenie. Tali modificazioni modulano e alterano l'espressione genica senza cambiare la sequenza del DNA. Modificazioni epigenetiche sono numerose e sono date da metilazione del DNA, acetilazione, fosforilazione, ubiquitinazione degli istoni, *etc.* (Portela and Esteller 2010).

I farmaci inibitori delle *DNMT* (DNA metiltransferasi) sono stati sintetizzati da ormai quasi mezzo secolo, come analoghi della citosina ad azione citotossica, da utilizzare come chemioterapici (Issa *et al.*, 2005; Gore *et al.*, 2006) (Fig.15).

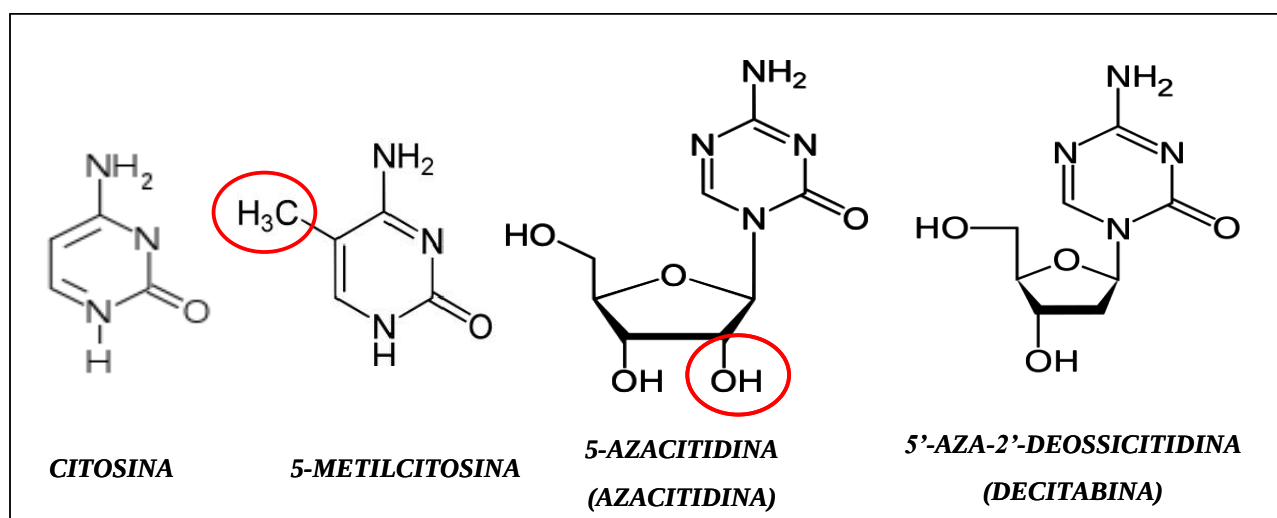


Figura 15. Struttura dell’Azacitidina e della Decitabina.

In questi analoghi il residuo 5’ dell’anello pirimidinico citosinico è sostituito con una molecola di fluoro o di azoto (Fig. 16) (Piml *et al.*, 1964). Tale sostituzione impedisce la metilazione, pertanto quando il farmaco si integra nel filamento di DNA, la *DNMT* viene bloccata.

Benché vi siano altri inibitori delle *DNMT* sintetizzati e di possibile uso clinico, i farmaci attualmente impiegati sono 5-azacitidina e 5-aza-2’deossicitidina o decitabina. Il primo si integra nell’RNA e poi nel DNA, mentre la decitabina si integra solo e direttamente nel DNA. Dunque pur essendo analoghi e avendo lo stesso effetto inibente le *DNMT*, si tratta senz’altro di farmaci con un diverso spettro di azione. Tali farmaci hanno anche un effetto citotossico, ma finché sono stati usati a dosaggi elevati non hanno manifestato proprietà terapeutiche superiori alla citosina arabinoside, bensì maggiore tossicità.

Solo recentemente, dopo la scoperta della loro attività di inibizione delle *DNMT*, l’azacitidina e la decitabina sono state usate a dosaggi molto inferiori, tali da determinare solo l’effetto ipometilante e non citotossico (Oki *et al.*, 2008; Issa *et al.*, 2003; Sauntharajah *et al.*, 2003; Santini *et al.*, 2001).

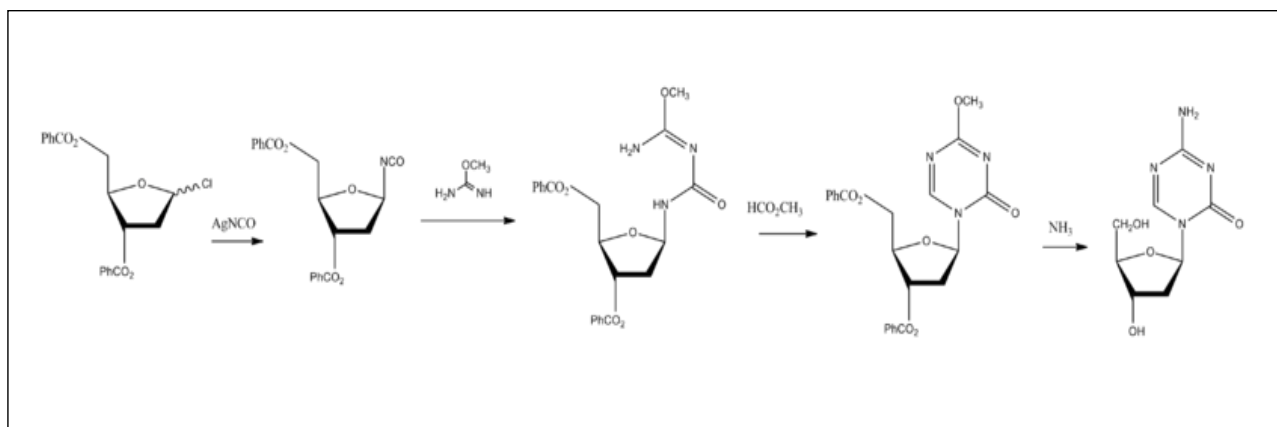


Figura 16. Sintesi della Decitabina. (Piml *et al.*, 1964).

I.2. SILENZIAMENTO EPIGENETICO

L'EPIGENETICA

L'*epigenetica* è definita come lo studio dei cambiamenti ereditari nell'espressione genica, associati a modificazioni del DNA o delle proteine della cromatina, non riconducibili ad alterazioni nella sequenza primaria del DNA (Egger *et al.*, 2004; Zoghbi and Beaudet, 2007; Feinberg, 2008).

La cromatina è costituita da unità ripetute di nucleosomi, i quali presentano un nucleo formato da un complesso di otto proteine istoniche (H2A, H2B, H3 e H4), intorno al quale si avvolge il DNA a doppio filamento di circa 146bp (Luger *et al.*, 1997).

I meccanismi epigenetici che modificano la struttura della cromatina possono essere suddivisi in quattro grandi categorie:

- Metilazione del DNA
- Modificazioni covalenti degli istoni
- Modificazioni non covalenti come l'inserimento di varianti istoniche o il rimodellamento dei nucleosomi

Le modificazioni non covalenti, come il rimodellamento dei nucleosomi, e la sostituzione delle canoniche proteine istoniche con varianti specializzate giocano un ruolo importante nella modulazione della struttura della cromatina associata alla regolazione dell'attività genica.

Oltre ad essere la struttura base per il *packaging* del DNA all'interno della cellula, i nucleosomi regolano l'espressione genica alterando l'accessibilità di sequenze regolatrici del DNA ai fattori di trascrizione (Jiang *et al.*, 2009).

- *Non-coding RNA (ncRNA)*, inclusi i microRNAs.

Queste modificazioni cooperano per la regolazione funzionale del genoma alterando le strutture dinamiche della cromatina, soprattutto regolandone accessibilità e compattezza.

L'interazione tra questi meccanismi di regolazione crea un "paesaggio epigenetico" che modifica il tipo di espressione del genoma dei mammiferi in diversi tipi cellulari, in differenti stadi di sviluppo, stadi di malattia o nel cancro (Jones *et al.*, 2007; Bernstein *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2009).

MECCANISMI DI REGOLAZIONE EPIGENETICA

METILAZIONE DEL DNA

Per metilazione del DNA s'intende l'aggiunta di un gruppo metilico da un donatore universale, S-adenosil-L-metionina (SAM), all'atomo di carbonio posto in posizione 5' dell'anello pirimidinico della citosina, che porta alla formazione della 5-metilcitosina (5me) (Chiang *et al.*, 1996).

La reazione è catalizzata dall'enzima DNA metil-transferasi (DNMTs) (Goll *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007).

I precisi *pattern* di metilazione del DNA nel genoma dei mammiferi sono originati e conservati nelle generazioni dall'attività cooperativa delle *de novo* metiltransferasi (DNMT3A, DNMT3B, che agiscono indipendentemente dalla replicazione cellulare e mostrano uguale preferenza per entrambi i filamenti di DNA, non metilato ed emimetilato) e delle DNMT1 (che agiscono durante la replicazione metilando preferenzialmente il filamento di DNA emimetilato (Kim *et al.*, 2002; Okano *et al.*, 1999). Nella specie umana e negli altri mammiferi questa modificazione avviene soltanto sulle citosine che precedono le guanine nella sequenza del DNA: i dinucleotidi CpG (Rideout *et al.*, 1990), dove la « p » indica il legame fosfodiesterico tra la citosina e la guanina).

I dinucleotidi CpG non sono uniformemente distribuiti all'interno del genoma, ma sono concentrati in piccoli tratti ricchi in CpG, chiamati *CpG islands*, ed in tratti contenenti sequenze ripetute (Bird *et al.*, 2002; Takai *et al.*, 2002).

Le *CpG islands* si trovano generalmente all'estremità 5' dei geni e occupano circa il 60% dei promotori dei geni umani (Wang *et al.*, 2004). Mentre la maggior parte dei siti CpG nel genoma è metilata, le *CpG-islands* restano non metilate durante lo sviluppo e nei tessuti differenziati (Suzuki *et al.*, 2008).

Tuttavia, alcuni promotori contenenti *CpG-islands* diventano metilati durante lo sviluppo e ciò si traduce in un silenziamento trascrizionale a lungo termine (Bird *et al.*, 2002). Negli organismi più semplici come la *Drosophila*, invece, c'è poca o alcuna metilazione del DNA (Bird *et al.*, 2002), e studi nei mammiferi hanno consentito di correlare i *pattern* di metilazione del DNA all'espressione genica: la metilazione nel promotore di un gene è generalmente associata al silenziamento del gene stesso (Bird *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 1999; Herman *et al.*, 1999).

Nelle cellule degli organismi più sviluppati la metilazione si verifica in una porzione molto estesa del DNA che non codifica geni (*noncoding DNA* o *ncDNA*), mantenendo quindi un'elevata quantità di DNA non codificante in uno stato trascrizionalmente inerte. Inoltre, il DNA con maggiore

metilazione replica più tardi rispetto a quello non metilato (Antequera *et al.*, 1993), il che significa che la metilazione aiuta ad assicurare una replicazione tardiva di gran parte del genoma.

La replicazione tardiva è associata alla formazione di cromatina inattiva, che facilita il silenziamento trascrizionale delle regioni non codificanti (Bird *et al.*, 1999).

Questo processo potrebbe aiutare a prevenire la trascrizione di una larga parte del genoma che contiene sequenze ripetute, sequenze virali inserite e trasposoni, considerando che la trascrizione di questi elementi porterebbe danno cellulare (Bestor *et al.*, 1990; 1998). Inoltre, la metilazione può determinare silenziamento genico prevenendo o promuovendo il reclutamento di proteine con funzione regolatrice a livello del DNA. Per esempio, può inibire l'attivazione trascrizionale bloccando l'accesso dei fattori di trascrizione ai propri siti target, es. c-myc e MLTF (Prendergast *et al.*, 1991; Watt *et al.*, 1988). In alternativa, può fornire siti di legame per proteine con domini che riconoscono la metilazione, le quali possono mediare la repressione genica attraverso l'interazione con le istone-deacetilasi (HDACs) (Jones *et al.*, 1998; Nan *et al.*, 1998).

MODIFICAZIONI COVALENTI DEGLI ISTONI

Gli istoni che compongono il *core* nucleosomico presentano un dominio C-terminale globulare ed un'estremità N-terminale non strutturata (Luger *et al.*, 1997). L'estremità N-terminale, che si estende fuori dal nucleo DNA-istoni, può subire diverse modificazioni covalenti post-trascrizionali come la metilazione, l'acetilazione, l'ubiquitinazione, la sumoilazione e la fosforilazione a livello di specifici residui amminoacidici.

Tali modificazioni regolano processi cellulari chiave come la trascrizione, la replicazione e la riparazione del materiale genetico (Kouzarides *et al.*, 2007).

Il complemento di modificazioni è proposto per garantire la memoria epigenetica nella cellula sotto forma di “codice istonico” che determina la struttura e l'attività di differenti regioni cromatiniche (Jenuwein *et al.*, 2001).

A differenza della metilazione del DNA, le modificazioni degli istoni possono portare ad attivazione o repressione a seconda di quali residui vengano modificati e dal tipo di modificazioni presenti. Per esempio, l'acetilazione della lisina è associata ad attivazione della trascrizione (Kouzarides *et al.*, 2007; Hebbe *et al.*, 1988), mentre la metilazione della lisina porta ad attivazione trascrizionale o a repressione a seconda di quale residuo venga modificato e dal grado di metilazione.

Infatti, la trimetilazione della lisina in posizione 4 dell'istone H3 (H3K4me3) si verifica a livello dei promotori di geni trascrizionalmente attivi, mentre la trimetilazione in posizione 9 ed in posizione 27 dell'istone H3 (H3K9me3) (H3K27me3) è presente sui promotori di geni trascrizionalmente inattivi (Kouzarides *et al.*, 2007).

Le modificazioni degli istoni vengono regolate dagli enzimi in maniera dinamica tramite l'aggiunta o la rimozione di gruppi covalenti. Le istone acetiltransferasi (HATs) e istone metiltransferasi (HMTs) aggiungono, rispettivamente, gruppi acetili e metilici; mentre le istone deacetiltransferasi (HDACs) e le istone demetiltransferasi (HDMs) rimuovono, rispettivamente, gruppi acetili e metilici (Haberland *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2007).

Diverse HTMs, come SUV39H1, possono indirizzare la metilazione su specifici geni target reclutando direttamente le DNA metiltransferasi (DNMTs) per indurre silenziamento genico (Tachibana *et al.*, 2008; Lehnertz *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2009).

Oltre al diretto reclutamento delle DNMTs, le HMTs e le demetilasi influenzano i livelli di metilazione del DNA regolando la stabilità delle proteine DNMT (Esteve *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009).

Le interazioni tra il macchinario di metilazione del DNA e gli enzimi che modificano gli istoni aumenta ulteriormente la complessità della regolazione epigenetica, la quale determina e mantiene l'identità e la funzione della cellula.

ALTERAZIONI DELLA METILAZIONE DEL DNA NEL CANCRO

L'inizio e la progressione del cancro sono eventi accompagnati da profondi cambiamenti nello stato di metilazione del DNA, prima alterazione epigenetica ad essere stata identificata nel tumore (Feinberg *et al.*, 1983; Riggs *et al.*, 1983).

Il genoma di cellule tumorali è caratterizzato da un'estesa ipometilazione e da una ipermetilazione di *CpG islands* presenti su siti specifici dei promotori (Fig.17) (Jones *et al.*, 2002; Gal-Yam *et al.*, 2008). Mentre il meccanismo che induce questi cambiamenti globali è ancora da definire, recenti studi indicano che alcune di queste modificazioni si verificano in stadi molto precoci dello sviluppo del cancro e possono contribuire allo sviluppo del tumore (Feinberg *et al.*, 2006).

L'ipometilazione globale del DNA gioca un ruolo significativo nella tumorigenesi e si verifica a livello di sequenze ripetute, retrotrasposoni, promotori poveri in CpG e introni (Rodriguez *et al.*, 2006).

L'ipometilazione del DNA a livello di sequenze ripetute porta ad un aumento dell'instabilità genomica promuovendo riarrangiamenti cromosomiali (Jones *et al.*, 2002; Eden *et al.*, 2003).

A livello dei trasposoni, invece, può indursi nella loro attivazione e traslocazione in altre regioni geniche, determinando ulteriore instabilità genomica (Basame *et al.*, 2006). Inoltre, la stessa mancanza di metilazione può portare all'attivazione di geni promotori della crescita cellulare come R-Ras e MASPIN nel carcinoma gastrico, S-100 nel cancro del colon e MAGE (antigene associato al melanoma) nel melanoma (Wilson *et al.*, 2007), e ad una perdita dell'imprinting (LOI) nei tumori (Rainier *et al.*, 1993).

Pertanto, l'ipometilazione del DNA porta ad un'attivazione aberrante di geni e regioni non codificanti attraverso una varietà di meccanismi che contribuiscono allo sviluppo e alla progressione del tumore aumentando l'instabilità genomica e attivando i proto-oncogeni.

Al contrario, l'ipermetilazione sito-specifica contribuisce alla tumorigenesi silenziando geni oncosoppressori.

Da quando è stato scoperto il primo promotore con ipermetilazione delle *CpG islands*, Rb (gene oncosoppressore associato al tumore del retinoblastoma) (Greger *et al.*, 1989), è stato poi dimostrato che, nel tumore, altri oncosoppressori come p-16, MLH1 e BRCA1 subiscono silenziamento in seguito a metilazione (Jones *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2007; Baylin *et al.*, 2005).

Questi geni sono coinvolti in processi cellulari fondamentali nello sviluppo e nella progressione del tumore come il riparo del DNA, il ciclo cellulare, l'adesione cellulare, l'apoptosi e l'angiogenesi (Jones *et al.*, 1999).

Oltre all'inattivazione diretta di geni oncosoppressori, l'ipermetilazione del DNA può indirettamente inibire l'espressione di altre classi di geni, tramite silenziamento di fattori di

trascrizione o geni per il riparo del DNA. Per esempio il silenziamento di fattori di trascrizione indotto tramite metilazione del promotore, come RUNX3 nel carcinoma gastrico (Long *et al.*, 2007), e GATA-4 e GATA-5 nel carcinoma coloretale e gastrico (Akiyama *et al.*, 2003) porta ad inattivare i loro target a valle.

Il silenziamento dei geni per il riparo del DNA (MLH1, BRCA1, ecc.) facilita nelle cellule un maggiore accumulo di lesioni genetiche che si traduce in una rapida progressione del tumore.

Mentre l'abilità dell'ipermetilazione del DNA di silenziare geni oncosoppressori nel cancro è nota, come questi geni siano identificati come i target di metilazione, resta da chiarire.

Una possibilità è che i geni silenziati in modo specifico forniscano un vantaggio alle cellule, aiutando la selezione e la proliferazione cellulare (Di Croce *et al.*, 2002).

La metilazione tumore-specifica delle *CpG islands* si verifica attraverso un meccanismo sequenza-specifico grazie al quale le DNMTs riconoscono specifici geni tramite l'associazione con fattori di trascrizione oncogenici (Di Croce *et al.*, 2002).

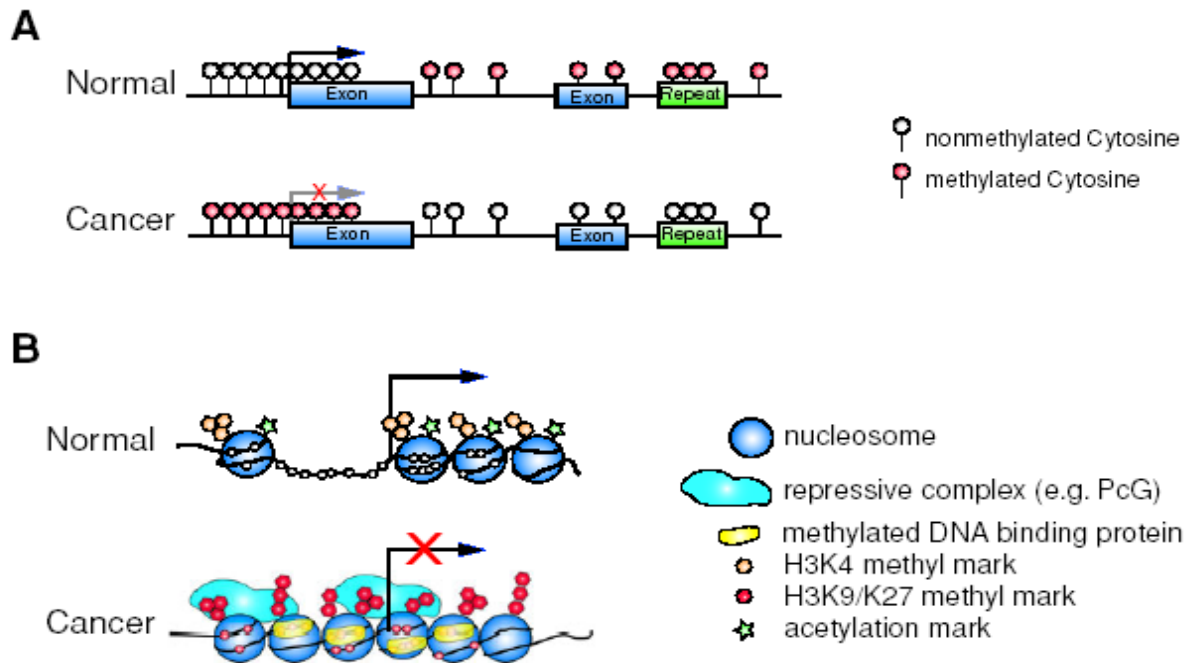


Figura 17. Alterazioni della metilazione nel cancro.

Nelle cellule normali i promotori dei geni oncosoppressori attivi presentano CpG non metilate, acetilazione degli istoni e metilazione H3K4, determinando la formazione di una struttura aperta della cromatina che la rende trascrizionalmente attiva. Invece, le regioni ripetitive, i trasposoni, le regioni intergeniche povere in CpG, e i promotori di geni sottoposti ad imprinting, sono fortemente metilati, sottoposti a marcatura istonica come la metilazione H3K9 e pertanto trascrizionalmente inattivi. Durante la tumorigenesi, i promotori dei geni oncosoppressori, che contengono *CpG islands* diventano metilati e ciò si traduce in una struttura silente della cromatina e in un silenziamento aberrante mentre, le sequenze ripetute, i trasposoni e i promotori di geni sottoposti ad imprinting diventano ipometilati e di conseguenza trascrizionalmente attivi. (Gal-Yam *et al.*, 2008).

I.3. I microRNA

I microRNA

I microRNA (miRNA) sono un'ampia classe di piccoli RNA non codificanti di 21-25 nucleotidi che regolano negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale (He and Hannon, 2004) mediante appaiamento con specifici RNA messaggeri (mRNA), inducendone la degradazione o impedendone la traduzione nel corrispondente prodotto (Kim, 2005; Petersen *et al.*, 2006).

Le prime evidenze sull'esistenza dei microRNA risalgono al 1993 quando il gruppo di Victor Ambros (Ambros *et al.*, 1993) identificò mediante *screening* genetico di geni alla base di difetti nel controllo temporale dello sviluppo post-embrionale nel nematode *C. Elegans*, un piccolo RNA non codificante di 22 nucleotidi, chiamato lin-4.

Quest'ultimo risultava essere parzialmente complementare con sette nucleotidi conservati nella regione 3' non tradotta dell'mRNA che codifica per la proteina nucleare LIN-14 (Lee *et al.*, 1993), la cui sottoespressione essenziale per la corretta progressione temporale dal primo al secondo stadio di sviluppo larvale.

L'evidenza della complementarità di sequenze fra lin-4 e lin-14, unita al fatto che mutazioni a carico di lin-4 fossero in grado di alterare il corretto andamento dello sviluppo, suggerì una serie numerosa di studi molecolari e biochimici che condussero alla dimostrazione che l'interazione diretta fra i due RNA è responsabile del controllo dell'espressione della proteina LIN-14 (Ha *et al.*, 1996; Wightman *et al.*, 1993).

Mediante un analogo meccanismo fu scoperto che lin-4 era in grado di regolare negativamente anche il gene lin-28 coinvolto in uno stadio più avanzato dello sviluppo larvale di *C. Elegans* (Moss *et al.*, 1997). Questi risultati condussero all'identificazione di un meccanismo completamente nuovo di regolazione genica post-trascrizionale coinvolto nei processi di sviluppo.

Dopo questa scoperta i microRNA sono stati individuati anche negli animali e nelle piante; è ormai accertato che tutti gli eucarioti pluricellulari, e perfino qualche unicellulare, si avvalgono dell'azione di questi piccoli RNA nella regolazione dell'espressione genica (Kent and Mendell, 2006).

Nell'uomo fino ad oggi sono stati identificati più di 400 microRNA ma alcune ricerche suggeriscono che il numero totale possa addirittura superare le mille unità (Bentwich *et al.*, 2005; Berezikov *et al.*, 2005).

Questa evidenza correlata alla loro natura regolatoria conferma il fatto, oggi supportato anche da numerosi dati sperimentali, che i microRNA possano agire non solo nello sviluppo ma nella maggior parte dei processi fisiologici della cellula, quali ad esempio la crescita e la divisione cellulare, l'apoptosi ed il differenziamento.

LA BIOSINTESI DEI microRNA

Il processo che conduce alla formazione dei microRNA maturi è stato recentemente chiarito (Fig.18) (Garofalo and Croce, 2011). I geni per i microRNA possono essere localizzati nel genoma singolarmente, o in *cluster*, in regioni intergeniche o addirittura, come suggeriscono numerose evidenze, nelle sequenze introniche di specifici geni (Rodriguez *et al.*, 2004).

I geni per i microRNA sono generalmente trascritti nel nucleo dalla RNA polimerasi II (PolII) in lunghi precursori, i pri-miRNA. Questi ultimi vengono processati da un'endonucleasi (RNasi di tipo III) Drosha, e dal suo cofattore DGCR-8 (Pasha in *Drosophila*), per formare un trascritto di 70 nucleotidi chiamato pre-miRNA che consiste di una struttura a forcina imperfetta.

Drosha è prevalentemente localizzata nel nucleo e presenta due domini sequenziali con attività di RNasi III, un dominio di legame per gli RNA a doppio filamento e un segmento N-terminale a funzione ancora ignota (Lee *et al.*, 2003). Sebbene il meccanismo mediante il quale Drosha riesca a discriminare i differenti precursori dei microRNA sia ancora sconosciuto, le evidenze sperimentali odierne stanno portando alla luce il ruolo chiave della struttura stessa del pri-microRNA in questo processo. Infatti l'inefficienza del processamento da parte di Drosha dipende dalla grandezza dell'ansa terminale, dalla struttura della forcina, e dalle sequenze fiancheggianti il sito riconosciuto di taglio, poiché è stato osservato che mutazioni che alterano le caratteristiche di queste regioni inducono in maniera significativa l'inibizione della sua attività (Zeng *et al.*, 2003).

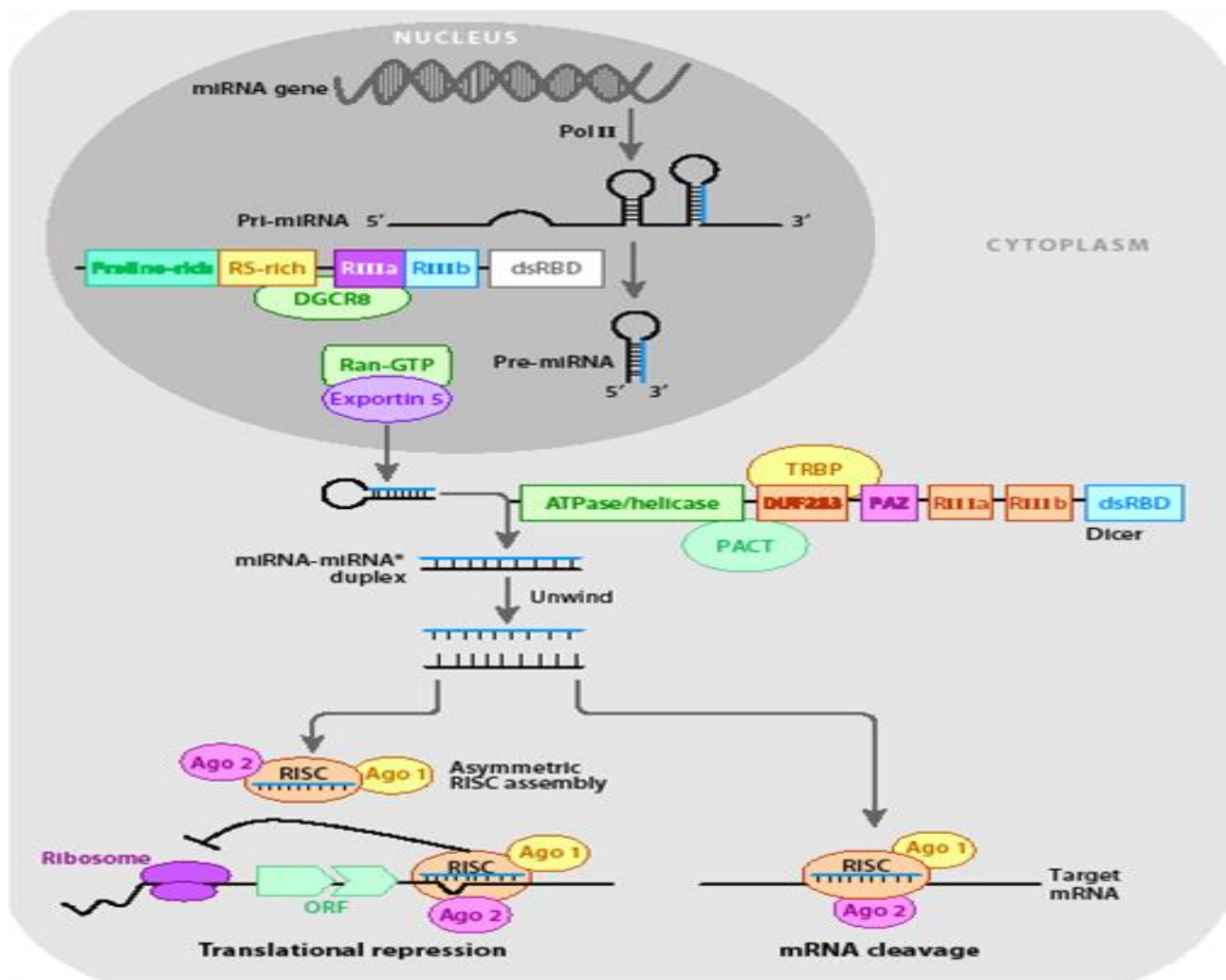


Figura 18. La biogenesi dei microRNA. (Garofalo and Croce *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2011)

Dopo questo passaggio iniziale, il pre-microRNA viene esportato grazie al trasportatore della famiglia delle RAN-GTPasi Esportina 5 (Exp5), dal nucleo verso il citoplasma dove un'altra RNasi di tipo III, Dicer, ne catalizza un ulteriore processamento che conduce alla formazione di un RNA di circa 22 nucleotidi a doppio filamento imperfetto (duplex) (miRNA:miRNA*) contenente sia il filamento del microRNA maturo sia (miRNA) sia il suo complementare (miRNA*) (Murchison. and Hannon., 2004). La proteina Dicer, di circa 200 kDa, contiene due domini RIIIa e RIIIb, ad attività Rnasica, un dominio con attività ATPasica ed elicasica, un dominio DUF283 a funzione ancora ignota, un dominio di legame C-terminale di legame con gli RNA duplex ed un dominio PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille).

Quest'ultimo risulta essere fondamentale nel riconoscimento dell'estremità 3' protudente generato dal taglio catalizzato da Drosha (Lingel *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2003) e potrebbe inoltre essere il responsabile del corretto posizionamento della regione ad attività Rnasica di Dicer sul sito di taglio del pre-microRNA (Fig.19) (Carmell and Hannon, 2004).

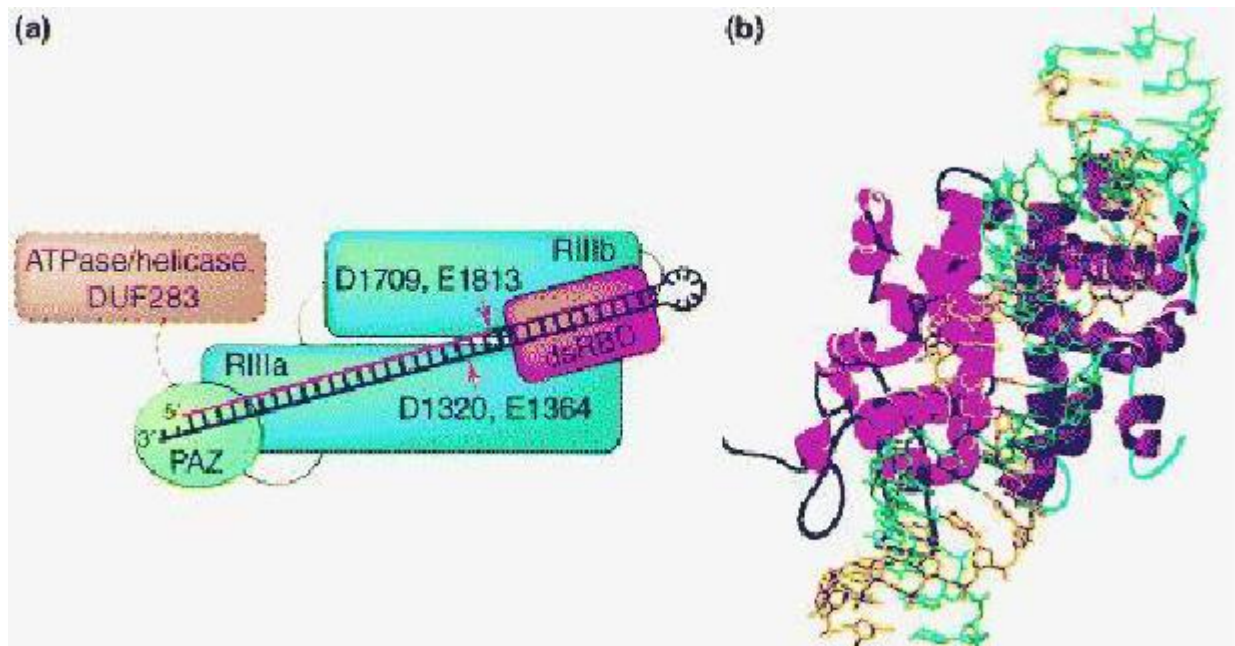


Figura 19. Struttura dell'RNasi di tipo III Dicer.

a) Schema che riassume un possibile meccanismo del processamento del pre-microRNA da parte di Dicer. Il posizionamento dei domini RIII dimostra l'asimmetria della regione catalitica, con RIIIa che taglia il braccio discendente ed RIIIb ascendente del pre-microRNA (freccie rosse). **b)** Modello di interazione dell'RNasi III di batterio (*Aquifex aeolicus*) con RNA a doppio filamento. Questa interazione potrebbe essere molto simile a quella di Dicer. Tratto da Filipowicz *et al.*, 2005.

L'ultimo stadio per la formazione dei microRNA richiede l'intervento di RISC (*RNA induced-silencing complex*), il complesso proteico che induce il silenziamento dell'RNA. La selezione dell'RNA messaggero bersaglio specifico e l'inefficienza funzionale di un microRNA richiedono che il filamento maturo del microRNA, proveniente dal duplex miRNA:miRNA*, sia selettivamente incorporato nel complesso RISC (Schwarz *et al.*, 2003; Khvorova *et al.*, 2003). Il filamento complementare miRNA* viene, al contrario, rapidamente degradato. Sebbene i microRNA maturi possano risiedere su entrambi i filamenti del RNA duplex, è stato osservato che l'incorporazione preferenziale in RISC di uno rispetto all'altro è principalmente dovuta all'instabilità relativa all'estremità 5', ovvero viene scelta come microRNA attivo e maturo la molecola dotata di una minore stabilità alla sua estremità 5'.

Sono dunque le proprietà termodinamiche del microRNA precursore a determinare l'assemblaggio asimmetrico RISC e di conseguenza, la specificità dell'mRNA bersaglio durante il meccanismo di inibizione post-trascrizionale (He and Hannon, 2004).

MECCANISMO D'AZIONE E IL RUOLO MULTIFUNZIONALE DEI microRNA

Come è stato accennato precedentemente, il complesso RISC è formato da una serie di proteine fra le quali spiccano quelle della famiglia Argonauto (Bernstein *et al.*, 2001).

Quest'ultime presentano due domini caratteristici conservati: il dominio PAZ, presente anche in Dicer, ed il dominio Piwi. Il dominio PAZ, sia in *H. sapiens* (hAgo2) sia in *Drosophila*, contiene un sito di legame per gli acidi nucleici (OB) come mostrato nella figura 20a, mentre Piwi, considerata la sua omologia strutturale con la RNasi H, sembrerebbe essere imputato nel processo di taglio dell'mRNA bersaglio (Song *et al.*, 2004).

Il meccanismo mediante il quale il complesso RISC-microRNA induce il suo effetto regolatorio di silenziamento dell'RNA messaggero, viene spiegato secondo una doppia modalità di azione che consiste nella degradazione dell'mRNA stesso o nell'inibizione della sua traduzione.

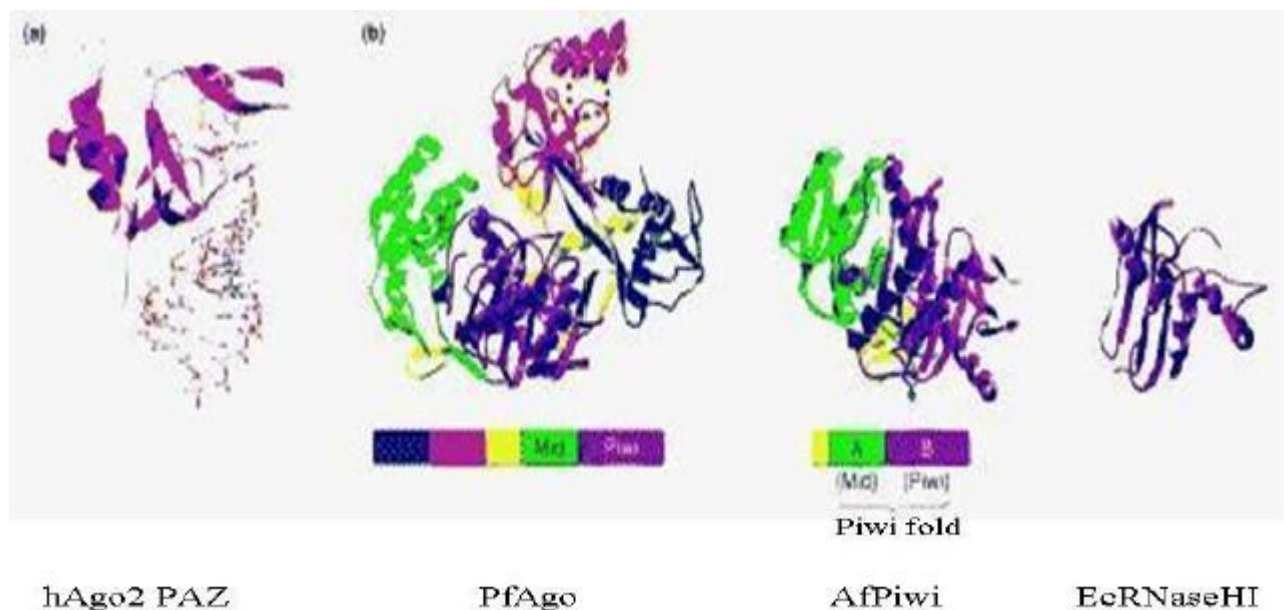


Figura 20. Struttura delle proteine Argonauto.

a) Struttura del dominio PAZ di Ago2 di *H. Sapiens* in un complesso con dsRNA di 7bp. Il dominio PAZ assomiglia ad un ripiegamento OB (di legame ad acidi nucleici). **b)** Strutture proteiche di PfAgo, AfPiwi e EcRNAseHI. Tratto da Filipowicz *et al.*, 2005.

Questo dipende dal grado di complementarità fra la sequenza del microRNA e quella del suo bersaglio (Fig.18). Infatti i microRNA che si legano con complementarità perfetta ai loro RNA messaggeri target, ne determinano la degradazione; in questo caso è presente un solo sito di

appaiamento che generalmente si trova sulla ORF (*open reading frame*) o sequenza codificante dell'mRNA bersaglio.

Questa modalità di azione omologa a quella dell'*RNA interference* viene comunemente riscontrata nelle piante (Hake, 2003). Al contrario, negli animali, eccetto poche eccezioni come ad esempio quella di mir-196 (Yekta *et al.*, 2004), i microRNA, appaiandosi in maniera imperfetta con sequenze specifiche delle regioni non tradotte al 3' (3'UTR) dei loro messaggeri target, ne inducono l'inibizione della traduzione (He and Hannon, 2004; Doench *et al.*, 2004).

In questo tipo di regolazione, è stato osservato che la sequenza dei primi 7-8 nucleotidi che si trovano al 5' del microRNA, meglio conosciuta come *seed sequence*, si appaia in maniera perfettamente complementare con il sito sul 3'UTR dell'mRNA bersaglio, e che questo appaiamento è fondamentale per il corretto funzionamento dell'azione del microRNA.

Per la caratterizzazione funzionale di un microRNA risulta essere determinante l'identificazione accurata del suo (o dei suoi) mRNA bersaglio. Il fatto che negli animali i microRNA conducano la loro azione tramite complementarità perfetta solamente dei nucleotidi 2-7 o 2-8 della *seed sequence*, complica notevolmente lo studio per l'individuazione dei geni bersaglio di ogni microRNA, poiché una sequenza così corta potrebbe teoricamente essere complementare ad un numero enorme di sequenze nei 3'UTR di tutto il genoma, conducendo all'identificazione di molti falsi positivi.

Per cercare di ridurre e di indirizzare correttamente questo studio, negli ultimi anni, sono stati sviluppati una serie di programmi di predizione bioinformatica basati su algoritmi matematici, come ad esempio TargetScan, PicTar e Miranda che identificano gli ipotetici mRNA target di ogni specifico microRNA.

Questi supporti informatici, accessibili in rete

(www.targetscan.org, <http://pictar.bio.nyu.edu>/<http://www.microrna.org/microrna/searchMirnas.do>), tengono in considerazione oltre che la complementarità, alcuni parametri importanti come la conservazione evolutiva fra varie specie e la stabilità termodinamica dell'eteroduplex formatosi dall'interazione fra microRNA e 3'UTR; anche se il target deve essere sempre successivamente validato da specifiche metodologie sperimentali, questo tipo di analisi rappresenta certamente il primo passo nello studio del ruolo funzionale di un microRNA.

Proprio mediante la predizione bioinformatica è stato stimato che per ciascun miRNA potrebbero esistere addirittura più di duecento geni bersaglio, che includono fattori di trascrizione, proteine secrete, recettori, trasportatori, e regolatori di vie intracellulari.

Questa enorme variabilità suggerisce che i microRNA possano essere coinvolti in quasi tutti i processi fisiologici della cellula, definendo un controllo regolatorio su circa un terzo degli RNA messaggeri di tutto il genoma umano (Esquela- Kerscher and Slack, 2006).

MicroRNA E CANCRO

Fra i processi biologici in cui è stato dimostrato il coinvolgimento dei microRNA ne spiccano alcuni, quali ad esempio l'apoptosi, il differenziamento e la proliferazione cellulare (Bartel, 2004; Harfe, 2005), la cui alterazione risulta essere frequentemente associata all'insorgenza ed allo sviluppo della patologia tumorale. Negli ultimi anni, numerosi gruppi di ricerca hanno osservato cambiamenti del profilo di espressione dei microRNA singoli o *in cluster* in vari tipi di tumore, come nel linfoma di Burkitt, nel cancro della mammella, nel carcinoma papillo-tiroideo, nel carcinoma epatocellulare e nel glioblastoma (Metzler *et al.*, 2004; Michael *et al.*, 2003; Takamizawa *et al.*, 2004; Iorio *et al.*, 2005; He *et al.*, 2005; Murakami *et al.*, 2006; Chan *et al.*, 2005; Ciafrè *et al.*, 2005).

Tutte queste evidenze hanno non solo suggerito che i microRNA sono direttamente coinvolti nello sviluppo e progressione tumorale ma hanno anche stimolato gran parte del mondo scientifico nella ricerca sia delle cause che delle conseguenze biologico funzionali dell'espressione cancro-specifica dei microRNA.

Infatti una più ampia delucidazione dei meccanismi molecolari che agiscono a monte e a valle potrebbero risultare di notevole interesse per lo sviluppo di possibili future strategie diagnostiche e terapeutiche per la cura dei tumori.

Le cause dell'alterata espressione dei microRNA nello sviluppo tumorale sembrano ancora scarsamente sconosciute e probabilmente possono essere imputate ad una serie di alterazioni che agirebbero singolarmente o insieme.

Fino ad oggi sono stati descritti almeno tre differenti meccanismi che comprendono la colocalizzazione di geni codificanti per microRNA e regioni genomiche associate al cancro, la regolazione epigenetica e l'alterazione di proteine coinvolte nel processamento e nella biogenesi dei microRNA (Calin and Croce, 2006).

Più della metà dei geni che trascrivono per i microRNA risiedono in particolari regioni genomiche che, nelle cellule cancerose, sono spesso soggette ad alterazioni (Calin *et al.*, 2004); possono comprendere regioni di LOH (*loss of heterozygosity*, perdita di eterozigotà) che contengono geni onco-soppressori, regioni di amplificazione che potrebbero contenere oncogeni, regioni comuni di rottura e siti fragili (*FRA*).

I *FRA* rappresentano siti preferenziali di scambio fra cromatidi fratelli, traslocazioni, delezioni, amplificazioni, e integrazione di plasmidi a DNA e virus associati al tumore come quello del papilloma umano (HPV).

Recenti evidenze hanno anche dimostrato un'associazione fra gli eventi epigenetici e l'espressione dei microRNA: ad esempio Scott e collaboratori hanno dimostrato che nelle cellule del carcinoma mammario l'inibizione dell'istone deacetilasi causa un'ampia variazione dei livelli di microRNA (Scott *et al.*, 2006). Inoltre uno studio condotto dal gruppo di Saito (Saito *et al.*, 2006) ha evidenziato tramite *microarrays* che fra i microRNA sovraespressi in cellule di cancro della vescica sottoposti a trattamenti con 5'-aza-2'-deossicitidina e l'inibitore dell'istone deacetilasi acido 4-fenilbutirrico spicca il mir-127.

Il gene codificante per questo microRNA è localizzato all'interno di un'isola CpG in una regione coinvolta in molti tipi di traslocazioni identificate nei tumori del sistema ematico e deleta per *LOH* nei tumori solidi. La riduzione della metilazione del DNA nei dintorni del sito di inizio della trascrizione potrebbe causare la sovraespressione di questo specifico microRNA il quale a sua volta potrebbe avere un effetto anticancerogeno poiché è coinvolto nella repressione diretta del fattore antiapoptotico BCL-6 (Saito *et al.*, 2006).

Le alterazioni delle proteine che fanno parte del macchinario coinvolto nella biosintesi dei microRNA producono effetti drammatici sull'espressione dei microRNA, ed infatti è stato osservato che la mancanza del processamento da parte di Drosha potrebbe spiegare la sottoespressione dei microRNA osservata in molti tumori primari (Thomson *et al.*, 2006).

Anche la riduzione di Dicer nel tumore del fegato è stata associata ad una cattiva prognosi e ad una ridotta sopravvivenza post-operatoria dei pazienti affetti da tale neoplasia (Harris *et al.*, 2005; Karube *et al.*, 2005), indicando che Dicer potrebbe essere in grado di prevenirne la trasformazione maligna. Le proteine Argonauta che, come è stato detto precedentemente, sono componenti cruciali del complesso RISC, sono state correlate con lo sviluppo di molti tipi di cancro, ad esempio tumori del neuroectoderma (Nelson *et al.*, 2003) o delle cellule germinali testicolari (Qiao *et al.*, 2002).

Solamente una piccola parte dei microRNA fino ad oggi identificati è stata associata con il proprio specifico ruolo biologico. Fra questi, molti dei microRNA che presentano una variazione di espressione nei tumori sembrerebbero essere coinvolti nel controllo di vie di trasduzione del segnale che hanno un'influenza sulla crescita cancerosa, come ad esempio la proliferazione e l'apoptosi, potrebbero perciò funzionare da oncogeni o da oncosoppressori (Fig.21). L'identificazione del loro bersaglio potrebbe consentire di distinguerli: in generale vengono considerati miR oncosoppressori quei microRNA la cui riduzione di espressione rispetto ad una situazione fisiologica causa la conseguente sovraespressione dei livelli del loro *target* molecolare, un oncogene, direttamente implicato nell'induzione dei processi correlati con la trasformazione tumorale (Fig.21b).

Al contrario, gli oncomiR, come si può osservare nella figura 21c, una volta attivati, inibiscono specificamente alcuni oncosoppressori, impedendo quindi la loro funzione di controllo delle

normali attività cellulari, e causano l'acquisizione da parte della cellula di una o più caratteristiche neoplastiche.

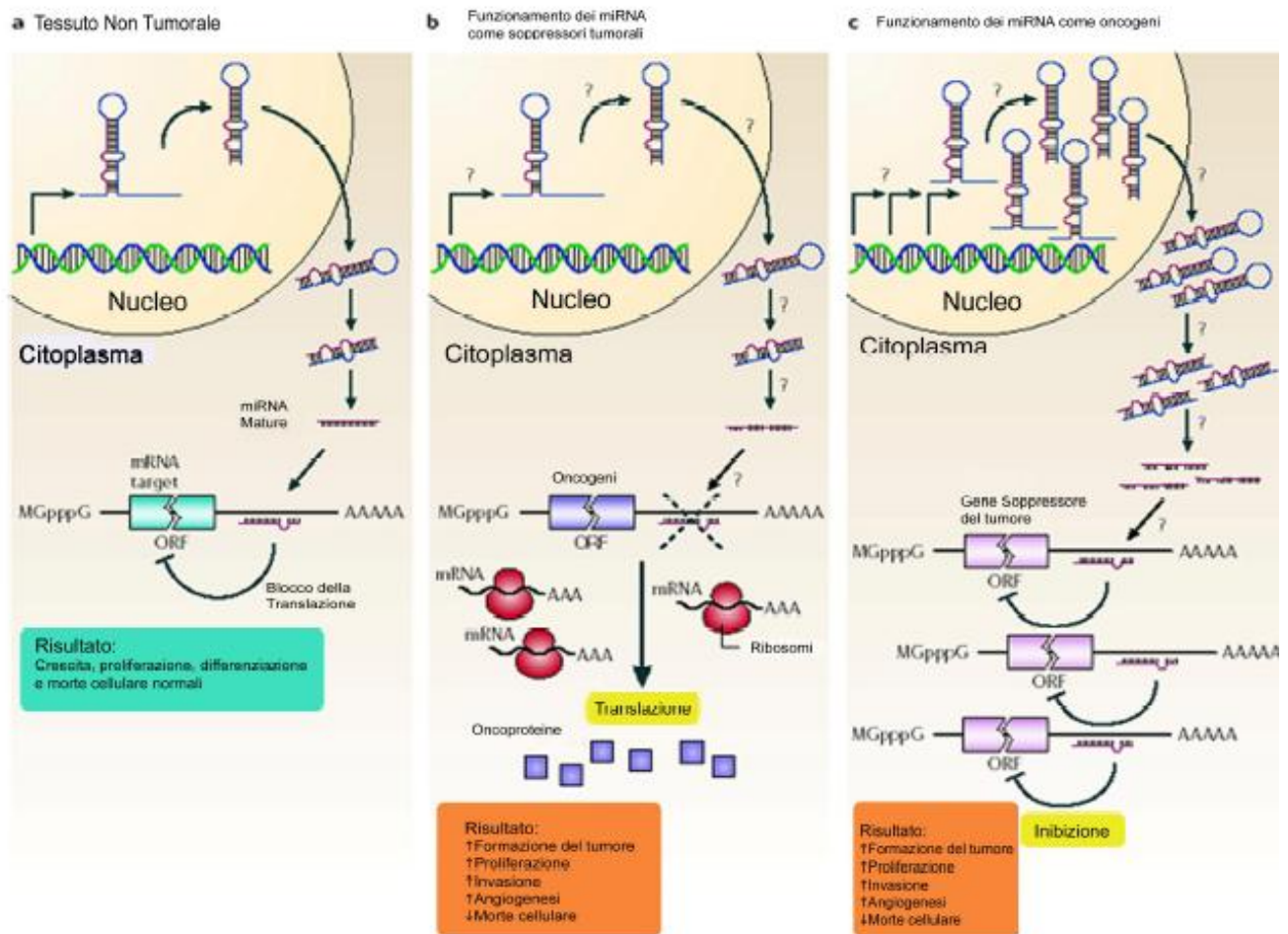


Figura 21. I microRNA oncosoppressori e oncogeni.

I microRNA possono funzionare sia da oncosoppressori sia da oncogeni. **a)** Nel tessuto normale un equilibrio fisiologico di espressione dei microRNA conduce ad un normale tasso di crescita cellulare, di proliferazione, differenziamento e morte cellulare. **b)** La riduzione o la delezione di un microRNA che funziona da oncosoppressore induce lo sviluppo del tumore tramite l'inappropriata espressione della sua oncoproteina bersaglio. **c)** L'amplificazione del microRNA con un ruolo oncogeno, elimina l'espressione del suo gene oncosoppressore *target* permettendo alla cellula l'acquisizione di una serie di caratteristiche neoplastiche quali l'aumento del tasso di crescita, dell'invasività e la resistenza all'apoptosi. (Modificato da Esquela-Kerscher and Slack, 2006).

MicroRNA ONCOSOPPRESSORI

La prima evidenza che alcuni microRNA potessero agire da oncosoppressori fu fornita dal gruppo di Calin che dimostrò come pazienti affetti da una comune forma di leucemia, la leucemia linfocitica cronica delle cellule B (CLL), presentino frequentemente delezioni o sottoespressione del

cluster intronico di microRNA comprendente miR-15a e miR-16-1 (Calin *et al.*, 2002). Il *locus* dove mappano questi due microRNA, il 13q14, risulta essere deleto in più del 65% dei casi di CLL come nel 16-40% dei mielomi multipli ed il 60% dei carcinomi prostatici. Più recentemente è stato dimostrato che miR-15a e miR-16-1 regolano negativamente il gene antiapoptotico BCL-2 la cui sovraespressione è stata riscontrata in molti tipi di cancro incluse le leucemie e i linfomi (Cimmino *et al.*, 2005).

Dunque, la delezione o la diminuzione dell'espressione di miR-15 e 16 induce un aumento del suo bersaglio molecolare promuovendo lo sviluppo della leucemia e del linfoma. Inoltre in alcuni pazienti è stata riscontrata una mutazione ereditaria per sostituzione di una citosina in timidina sette basi a valle del precursore di mir-16, che causa una riduzione dei livelli espressione di questo microRNA, rafforzando ancora di più il ruolo di miR-16 come oncosoppressore (Calin *et al.*, 2005). Anche i membri della famiglia dei microRNA Let-7, originariamente studiati per il loro coinvolgimento nel processo di sviluppo del nematode *C. elegans* (Reinhart *et al.*, 2000), mostrano un'attività oncosoppressiva in quanto regolano l'espressione del noto oncogene Ras. Le proteine Ras sono una famiglia di GTPasi di membrana che regolano la crescita cellulare e il differenziamento. Circa il 15-30% dei tumori umani presenta mutazioni di attivazione del gene Ras che inducono il processo di trasformazione maligna (Esquela-Kerscher and Slack, 2006).

I microRNA codificati dalla famiglia let-7, che include dodici omologhi umani, sono considerati come oncosoppressori poiché mappano su siti fragili correlati con il cancro del polmone, della mammella, dell'utero e della cervice (Calin *et al.*, 2004).

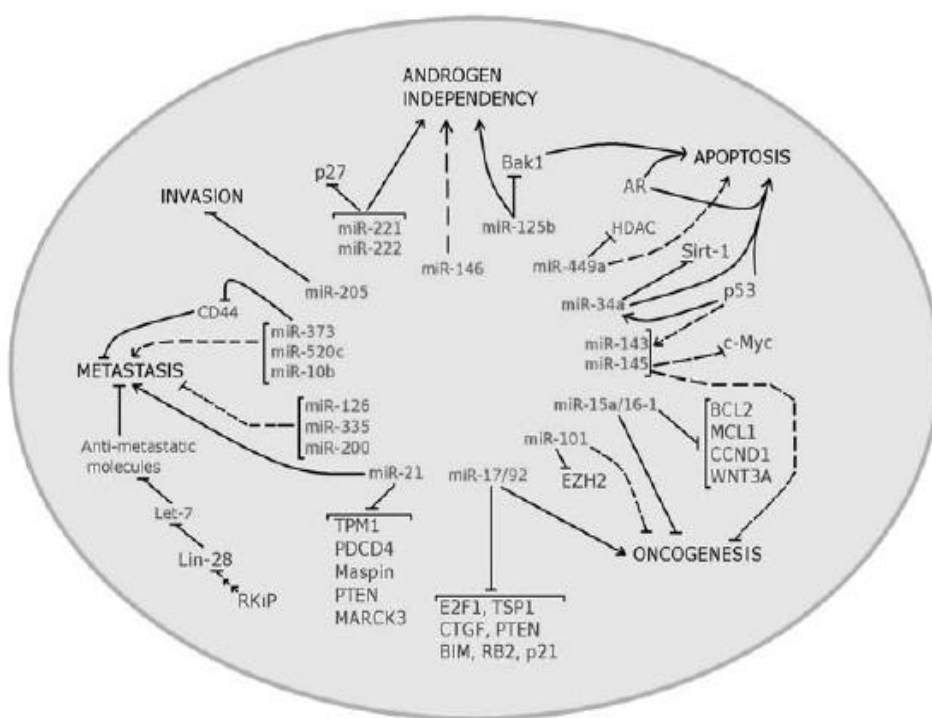
Recenti evidenze hanno inoltre dimostrato una diretta correlazione fra la sottoespressione di miR-143 e 145 ed il tumore del colon-retto (Michael *et al.*, 2003).

Risulta essere di notevole interesse il fatto che i livelli dei precursori di questi due microRNA sembrano essere ugualmente abbondanti nel tessuto normale rispetto al tumorale, suggerendo che la differenza di espressione dei miRNA maturi sia dovuta ad una qualche alterazione dei meccanismi di processamento e non di trascrizione dei precursori.

In un altro lavoro di Lin (Lin. *et al.*, 2008) si è visto come miR-146a sia sottoespresso nelle linee cellulari di cancro androgeno-indipendenti. *In vitro*, l'inserimento di miR-146a all'interno delle cellule PC3 porta alla diminuzione della loro proliferazione e sopravvivenza (Fig.22). L'espressione endogena di miR 146a limita le funzioni invasive o metastatiche. Questa mancanza di espressione nelle linee cellulari di cancro prostatico nello stato di indipendenza agli androgeni indica che potrebbe avere un ruolo funzionale nel *pathway* molecolare legato all'indipendenza dagli androgeni.

Lodygin in un lavoro (Lodygin. *et al.*, 2008) ha riportato che la mancata espressione di miR--34a nel cancro prostatico probabilmente dipende dall'irregolare metilazione delle isole CpG nel suo promotore. La trasfezione di miR-34a nelle linee cellulari PC3 causa la sottoespressione dell'mRNA e della proteina di SIRT1 (Fig.22).

Indipendentemente da SIRT1, l'ectopica espressione di miR-34a causa l'arresto del ciclo cellulare in fase G1, diminuisce la proliferazione cellulare e induce l'apoptosi. Agenti inducenti la rottura del doppio filamento del DNA attivano la proteina p53 *DNArepair-related* come meccanismo di sopravvivenza.



Le linee tratteggiate indicano le presunte interazioni, invece quelle dritte indicano le interazioni convalidate dei miR con i loro *target* e il loro ruolo nel *signaling* cellulare per lo sviluppo del cancro prostatico (Tratto da Sevli. *et al.*, 2010).

MicroRNA ONCOGENI

Numerose sono le evidenze riguardo al funzionamento dei microRNA come oncogeni. Molte di queste sono associate all'alterazione di proteine ben note per il loro coinvolgimento nella progressione dello sviluppo tumorale, come ad esempio l'oncogene MYC.

Quest'ultimo codifica per un fattore di trascrizione spesso mutato e amplificato nei tumori umani, che è un importante regolatore della crescita cellulare (Pelengaris *et al.*, 2002).

Una prima importante evidenza è suggerita dalla scoperta che un tipo aggressivo di leucemia insorge quando MYC trasloca nel *locus* di miR-142. Questa traslocazione inserisce il gene MYC immediatamente a valle della sequenza codificante il pri-microRNA-142 e sotto il controllo dello stesso promotore (Lagos-Quintana *et al.*, 2002).

La perdita di una regione conservata di circa venti nucleotidi che viene sostituita dalla traslocazione di MYC risulta nell'eliminazione del processamento del miR, provocando l'incremento di espressione di MYC e la trasformazione tumorale delle cellule di tipo B. Un altro noto microRNA , il miR-155, è associato alla sovraespressione di MYC ed a questo tipo di cancro.

Questo microRNA è costituito da ventuno nucleotidi che sono parte del più ampio RNA non codificante BIC (*B-cell integration cluster*), trovato sovraespresso nei linfomi delle cellule di tipo B sovraesprimenti MYC (Clurman and Hayward, 1989; Tam *et al.*, 1997).

Il gruppo di Metzler ha mostrato un incremento di espressione di circa cento volte di miR-155 nel linfoma di Burkitt, ed altri studi hanno dimostrato lo stesso andamento nel linfoma di Hodgkin, nei mediastinali primari e nel linfoma diffuso a cellule B grandi (Eis *et al.*, 2005; Kluiver *et al.*, 2005; van der Berg *et al.*, 2003). Inoltre sembra che questo stesso microRNA possa funzionare da oncogene in cooperazione con MYC nella tumorigenesi, mentre in condizioni normali, durante la selezione delle cellule B, probabilmente inattiva geni che contrastano l'azione di MYC. Una overespressione di miR-155 è stata anche osservata nel carcinoma mammario, in quello polmonare, della tiroide e del colon (Eis *et al.*, 2005; He *et al.*, 2005; Volinia *et al.*, 2006).

Il meccanismo mediante il quale BIC/miR-155 promuove lo sviluppo tumorale resta ancora sconosciuto. Sebbene sia stato dimostrato che il recettore di tipo I dell'angiotensina II sia un bersaglio molecolare del microRNA (Martin *et al.*, 2006), non sembra che questo possa essere il meccanismo regolatorio essenziale per l'attività oncogenica di miR-155, suggerendo che la ricerca di "altri *target* molecolari" sia importante nell'individuare il suo specifico ruolo nella trasformazione maligna.

Due lavori recentemente pubblicati hanno ulteriormente contribuito alla conferma della relazione fra miRNA, espressione di MYC e cancro (He *et al.*, 2005; O'Donnel *et al.*, 2005).

Dall'analisi delle linee cellulari e tessuti di pazienti affetti da linfoma delle cellule di tipo B è emerso che i microRNA maturi della famiglia 17-92, che comprende sette microRNA i cui geni risiedono nell'introne 3 del gene C13orf25, mostrano un sostanziale incremento di espressione rispetto a quella dei campioni di tessuti sani (He *et al.*, 2005). Allo stesso tempo è stato dimostrato che c-MYC induce l'espressione di sei di questi stessi microRNA sul cromosoma 13, conducendo allo sviluppo del linfoma umano (O'Donnel *et al.*, 2005).

Inoltre in cellule HeLa, l'espressione del fattore di trascrizione E2F1 è regolata negativamente dai miR-17-5p e miR-20, suggerendo un nuovo meccanismo mediante il quale MYC contemporaneamente, attiva la trascrizione di E2F1 e allo stesso tempo ne limita la traduzione grazie all'induzione di miR-17-5p e miR-20, esercitando così un controllo molto fine sul segnale di proliferazione (O'Donnel *et al.*, 2005). Woods e collaboratori hanno proposto un modello in cui i microRNA del gruppo miR-17-92 promuovono la proliferazione cellulare spostando l'equilibrio trascrizionale di E2F dal ruolo antiapoptotico di E2F1 a quello proliferativo mediato da E2F3 (Woods *et al.*, 2007).

Anche per miR-21 è stato proposto e successivamente confermato un ruolo da "oncomiR". La prima evidenza è stata fornita dalla forte sovraespressione riscontrata prima nel glioblastoma multiforme (Chan *et al.*, 2005) e poi nei campioni di tessuti di carcinoma della mammella rispetto a quelli sani.

L'inibizione di miR-21 mediante utilizzo di specifici oligonucleotidi antisenso in specifiche cellule di carcinoma mammario MCF-7 causa un aumento dell'apoptosi ed una riduzione della crescita cellulare; questo è in parte dovuto alla deregolazione dell'espressione di un *target* di miR-21, il fattore antiapoptotico Bcl-2 (Si *et al.*, 2007).

Contemporaneamente un altro gruppo di ricerca ha dimostrato che nel medesimo ambiente cellulare, miR-21 agisce ulteriormente andando ad inibire direttamente la tropomiosina 1, il cui ruolo fisiologico è quello di ridurre la proliferazione cellulare (Zhu *et al.*, 2007).

L'incremento di espressione di miR-21 è stata associata a molti altri tipi di tumori ed allo stesso tempo sono stati identificati altri bersagli molecolari, come ad esempio il noto oncosoppressore PTEN (Meng *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 2007).

Sembra infatti che l'azione oncogena di questo microRNA sia ad ampio raggio e possa esplicarsi mediante un meccanismo pleiotropico inibendo l'espressione di differenti oncosoppressori bersaglio nello stesso tipo di tumore od in tumori differenti.

Ancor più recenti sono le evidenze riguardo il coinvolgimento dei microRNA e del loro ruolo oncogeno negli stadi avanzati della progressione tumorale. Fra queste, sono di notevole interesse quelle fornite dal gruppo di Weinberg che dimostrano il coinvolgimento di miR-10b nell'indurre il

processo di metastatizzazione del tumore della mammella; infatti la sua overespressione in linee cellulari di carcinoma mammario non metastatizzanti causa un forte aumento del loro potenziale migratorio ed invasivo. Questo microRNA, la cui espressione è indotta direttamente dal fattore di trascrizione Twist, inibisce in maniera specifica la traduzione dell'mRNA di HOXD10, permettendo così l'espressione di geni (Ma *et al.*, 2007).

Un altro miR, miR-125b, ha un significativo effetto sulla tumorigenesi del cancro della prostata ed è coinvolto nella risposta pro-metastatica. La sua alterata regolazione ha effetto anche sull'indipendenza agli androgeni (Shi. *et al.*, 2007).

Infatti, miR-125b è upregolato in campioni clinici e nelle linee cellulari androgeno-indipendenti (Ozen. *et al.*, 2008; Shi. *et al.*, 2007; Lee. *et al.*, 2005).

Studi funzionali rivelano che l'overespressione di miR-125b nel cancro della prostata è correlata con la progressione androgeno-indipendente e con la sopravvivenza cellulare (Shi. *et al.*, 2007).

Her2 ed Her3 sono due proteine overesprese nel cancro prostatico e miR-125b ha la funzione di inibire la loro traduzione anche nel cancro della mammella (Scott. *et al.*, 2007).

L'aumento di espressione di miR125b potrebbe essere correlato con l'interazione di Her2 ed il recettore degli androgeni (AR) (Shi. *et al.*, 2007).

Lo stesso gruppo ha ricercato un nuovo target di miR125b Bak1 tramite esperimenti di espressione e il saggio della luciferasi *in vitro*. Bak1 e Bax regolano in modo sinergico la via di trasduzione del segnale per l'apoptosi (Shi *et al.*, 2007).

In un lavoro precedente, il gruppo di Volinia (Volinia *et al.*, 2006) ha riportato che miR106a è sovraespresso nel cancro della prostata ed in altri tumori ad eccezione del cancro al seno. Il suo *target* putativo RB1 è stato trovato sottoespresso nel cancro prostatico.

Altri miR importanti sono miR-221 e miR-222 che risultano upregolati in molti tipi di cancro e funzionano come “oncomir” a causa del loro *target* p27 (Galardi *et al.*, 2007; Mercatelli. *et al.*, 2008).

Tutte queste osservazioni confermano che i microRNA possono essere classificati come una famiglia di molecole direttamente implicate nella patologia del cancro, essendo, come abbiamo visto, coinvolti in prima linea in molti dei processi e delle vie molecolari che conducono allo sviluppo e alla progressione di un numero veramente ampio di tipi tumorali (Catto *et al.*, 2011) (Fig.23).

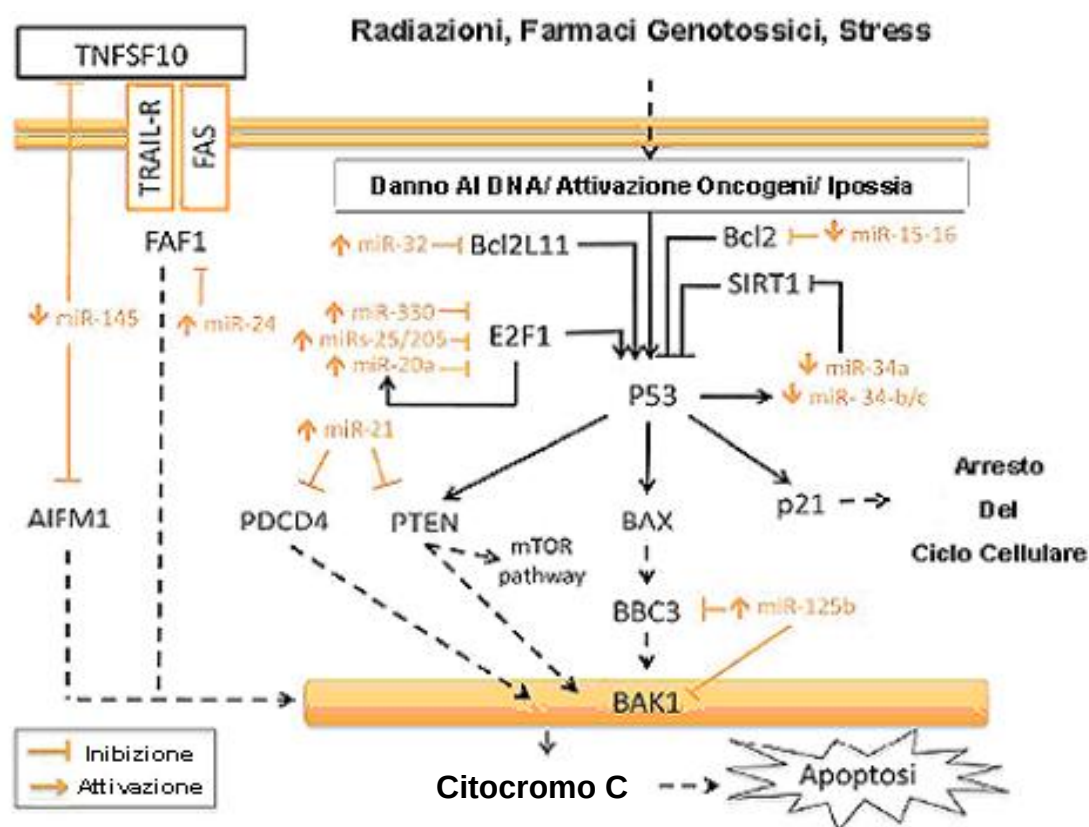


Figura 23. Target del pathway apoptotico nel cancro della prostata.

Numerosi microRNA (miRNAs) sono *target* del *signaling* apoptotico in modo sinergico, come illustrato in figura. L'espressione dei miR nella carcinogenesi è mostrata dalla freccia (Inibizione/Attivazione) ed ogni evento riconduce al *pathway* dell'apoptosi. Bloccare l'apoptosi è un evento chiave per lo sviluppo del cancro. (Ricreato da Catto. *et al.*, 2011).

In futuro la caratterizzazione di molti altri microRNA e l'identificazione dei loro bersagli molecolari associati si rivelerà di notevole importanza non solo per la comprensione dei meccanismi molecolari che sono alla base della trasformazione maligna ma soprattutto per lo sviluppo di strategie cliniche atte ad inibire la crescita tumorale (*target therapy*).

§ II. OBIETTIVO DELLA TESI

Questo progetto è stato ideato partendo dalla considerazione che l'inibizione di alcuni microRNA, causata da silenziamento epigenetico mediante metilazione delle *CpG Island* dei promotori, è associata ad alterazioni nel controllo del ciclo cellulare e dell'apoptosi.

Lo sviluppo di numerose patologie, come quelle tumorali, risulta essere correlato a questo meccanismo. Difatti, negli ultimi anni un numero crescente di evidenze sperimentali ha messo in relazione il cambiamento del profilo di espressione di microRNA (singoli od in *cluster*) con lo sviluppo di molti tipi di neoplasie (Metzler *et al.*, 2004; Michael *et al.*, 2003; Takamizawa *et al.*, 2004; Iorio *et al.*, 2005; He *et al.*, 2005; Murakami *et al.*, 2006; Chan *et al.*, 2005; Ciafrè *et al.*, 2005).

L'obiettivo principale del lavoro è di identificare specifici microRNA, contenenti *CpG Island* nella regione del promotore, che risultano essere silenziati tramite il meccanismo della metilazione in campioni biotici prostatici provenienti da pazienti affetti da cancro della prostata, e correlare tali dati con i risultati clinici diagnostici e prognostici.

La seconda parte della tesi approfondisce invece il ruolo funzionale associato ai microRNA; vale a dire identificarne i bersagli molecolari, ed in base a questi, identificare le vie molecolari ed i processi cellulari che vengono alterati dai microRNA durante lo sviluppo del carcinoma prostatico. Più in generale, lo scopo di questa tesi è quindi di chiarire il possibile ruolo dei microRNA nello sviluppo neoplastico del carcinoma prostatico. I risultati ottenuti potranno essere utili non solo per aggiungere un tassello scientifico alla comprensione del "puzzle eziologico" che è all'origine del tumore della prostata, ma anche per sviluppare nuove strategie atte ad inibire la crescita di questo tipo di neoplasia, con il fine ultimo di bloccare la progressione verso stadi più avanzati.

§ III. MATERIALI E METODI

COLTURE CELLULARI, TRATTAMENTO 5-aza-2'-deossicitidina (Decitabina) E PROFILO DI ESPRESSIONE DEI miRNA

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti utilizzando linee cellulari umane di carcinoma della prostata aderenti in monostrato. Le cellule LNCaP con modalità di crescita dipendente dagli androgeni sono derivate da una metastasi linfonodale sovraclaveare di un tumore umano poco aggressivo, riscontrato in un uomo di 50 anni di origine caucasica con diagnosi confermata di carcinoma della prostata metastatico (ATCC, CRL.1740; Horoszewicz JS. *et al.*, 1983). Al contrario, le PC3 derivano da una metastasi distale ossea di un adenocarcinoma prostatico di IV grado indipendente dagli androgeni, da un uomo di 62 anni di origine caucasica (ATCC, CRL.1435; Kaighn *et al.*, 1979). Anche le linee cellulari DU145 sono androgeno-indipendenti come le PC3, solamente che le DU-145 derivano da metastasi cerebrali di moderato potere metastatico, da un uomo di 69 anni di origine caucasica. Queste cellule non esprimono l'antigene prostatico (PSA) (ATCC, HTB-81; Papsidero *et al.*, 1981; Stone *et al.*, 1978).

Al contrario, le linee cellulari PrEC usate come controllo sono cellule primarie normali isolate dall'epitelio prostatico umano. I passaggi in coltura sono stati di 2 o 3 giorni al massimo. Cambrex/Lonza (Walkersville, MD) (LONZA, CC-2555). Il terreno di coltura utilizzato per queste cellule è PrEBM (Lonza, CC-3165) a cui è stato aggiunto il *Prostate Epithelial Growth Supplement* (Lonza, PrEGM CC-4177).

Tutte le linee cellulari sono state testate per confermare l'assenza di infezione da micoplasma. Le cellule sono state cresciute in colture monostratificate in terreno di coltura F12-K (ATCC) per le linee cellulari PC3, EMEM (*Eagle's Minimum Essential Medium*; LONZA) per le linee cellulari DU145, RPMI1640 (ATCC) per le linee cellulari LNCaP, a cui è stato aggiunto siero fetale bovino (FBS, Euroclone Devon U.K.) al 10% (v/v).

La crescita delle cellule è avvenuta incubandole in atmosfera umida al 5% di CO₂ a 37°C. Al raggiungimento del 70% di confluenza, le cellule sono state staccate dal fondo della piastra utilizzando tripsina 0.25% (Ca²⁺ e Mg²⁺ - free, SIGMA). Tutti gli esperimenti sono stati condotti ai primi passaggi in coltura.

Il tempo di duplicazione delle cellule è di circa 48h e la vitalità cellulare è stata determinata mediante la tecnica del colorante vitale Trypan-Blue (0,4% p/v) effettuata nella camera citometrica di Bürker.

Tutti i materiali in plastica per colture cellulari sono stati forniti dalla Necton Dickinsons Labware (Bedford, MA, USA).

Per studiare gli effetti del silenziamento epigenetico dovuto alla metilazione, le cellule sono state trattate per cinque giorni con l'agente demetilante *5-aza-2'-deossicitidina* (Decitabina) alla concentrazione finale di 3µM.

L'agente demetilante, disciolto in PBS, è stato aggiunto al terreno di coltura per 72h. Gli esperimenti sono stati eseguiti in duplicato. L'RNA totale è stato estratto dai pellet cellulari per mezzo del kit "miRNeasy Mini Kit" seguendo il protocollo fornito dalla ditta (Qiagen).

L'RNA è stato aliquotato e conservato a -80°C; 1µg di RNA estratto è stato diluito 1:100 (v/v) in H₂O DEPC e quantizzato allo spettrofotometro (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific), mentre per controllare la qualità dell'RNA estratto è stata eseguita l'elettroforesi su gel d'agarosio in camere Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad) ad un voltaggio costante di 120V per circa 20min.

La conferma del profilo di espressione con i relativi dati del processamento dei miR è stata eseguita in collaborazione con *Pietre Mestdagh al Center of Medical Genetics, Ghent Belgium*, (Mestdagh *et al.*, 2008; Mestdagh *et al.*, 2009).

ESTRAZIONE E CONVERSIONE BISULFITICA DEL DNA GENOMICO

Il DNA genomico è stato estratto con il *QIAamp DNA mini kit* (Qiagen) e sottoposto alla conversione bisulfitica con *Epiect Bisulfite Kit* (Qiagen). Lo stato di metilazione di una sequenza di DNA può essere determinato utilizzando il sodio bisolfito. L'incubazione del DNA bersaglio con questa sostanza determina la conversione delle citosine originariamente non metilate in uracile, lasciando immutate quelle metilate secondo lo schema qui sotto riportato.

	Sequenza Originale	Dopo trattamento bisulfitico
DNA non metilato	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N	N-U-G-N-U-G-N-U-G-N
DNA metilato	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N

Questo è ottenuto incubando il DNA in alta concentrazione del sale bisolfito con alta temperatura e a pH più basso tramite la reazione di solfonazione di seguito riportata.

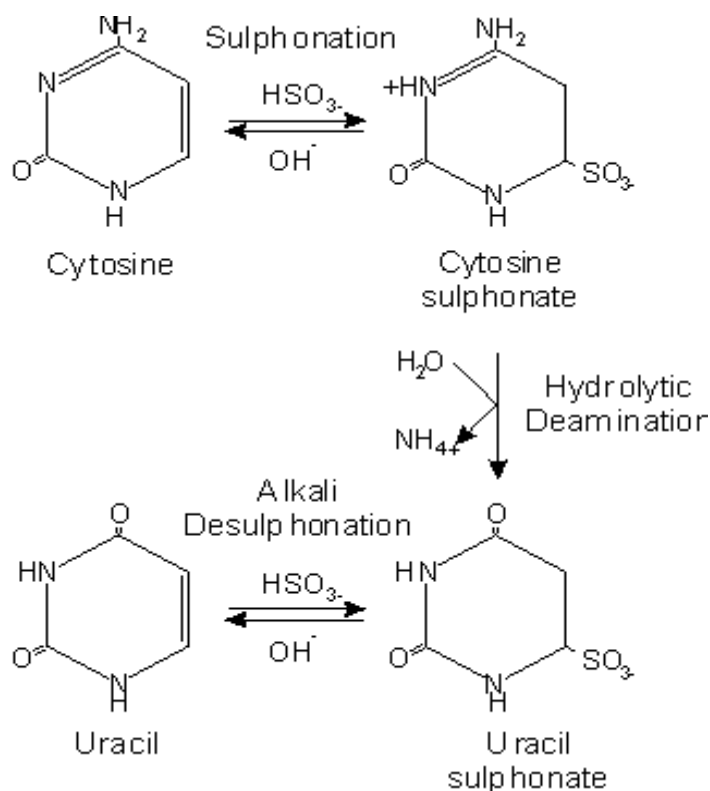


Figura 24. La conversione bisulfidica delle citosine non-metilata ad uracile.

Immagine presa da Selen Systems.

Il processo descritto (Kristensen and Hansen, 2009) inizia dal DNA a singolo filamento, il pH basso e lo ione sodico bisolfito (HSO_3^-) determinano la solfonazione del carbonio 6, la deaminazione idrolitica irreversibile a livello del carbonio 4 in uracile; infine, a condizioni alcaline, la desulfonazione in uracile. La presenza di un gruppo metilico a livello del carbonio 5 blocca la reazione.

In seguito, la procedura di *cleanup* è rivolta a rimuovere i sali ed altri residui che potrebbero interferire con i passaggi successivi.

Pertanto, 1500 ng di DNA genomico di ogni campione sono stati processati in un volume finale di 20 μl , secondo il protocollo fornito dalla ditta. Quindi il DNA convertito è stato risospeso in 40 μl di acqua distillata per ottenere una concentrazione finale di 30 ng/ μl . Il DNA bisolfitico è stato successivamente utilizzato come template per l'analisi mediante PCR specifica di metilazione (MS-PCR).

METHYLATION SPECIFIC PCR (MSP) NELLE LINEE CELLULARI

La *methylation specific PCR* (MSP) è una tipologia innovativa di PCR sensibile e specifica per l'individuazione della metilazione di qualsiasi blocco CpG presente nelle CpG island. Tale tecnica consente di distinguere il DNA metilato da quello non metilato, utilizzando il DNA genomico convertito in DNA bisulfitico, come precedentemente descritto. Il DNA contenente le citosine non modificate e quello contenente le citosine convertite in uracile tramite la reazione con il bisulfito, possono essere distinti tra loro per la presenza di differenze di sequenza. La frequenza dei siti CpG all'interno delle CpG Island rende questa tecnica unica nel suo utilizzo ed estremamente sensibile per l'identificazione della presenza di tali regioni (Herman JG, 1996). Tale procedura è stata scelta per verificare la presenza di siti metilati a livello del promotore dei microRNA in analisi.

I *primers* per l'MSP sono stati disegnati con il programma *MSPPrimer* e la lista è presente nella Tabella in dettaglio (Tab.2) (Brandes *et al.*, 2007). MSP di controllo sono state ottimizzate usando il DNA di controllo convertito con il bisolfito (*Epitect control DNA set*, Qiagen). Le condizioni della PCR e i *primers* sono illustrati in Tab.3.1. Gli amplificati sono stati controllati tramite elettroforesi su gel di agarosio. 10µl di PCR sono stati corsi su un gel di agarosio al 2% in TBE1X a 100V per 50min usando come marcatore il pUC18 (DNA *Msp* I Digest; Sigma). GelReDTM *Nucleic Acid Stain* (Biotium) è stato usato come intercalante del DNA, e la sua fluorescenza è stata visualizzata tramite lo strumento Chemidoc (Biorad).

Tabella 2. Sequenze di *Primers* usate in questo studio

Tecnica	Gene	Tipo di Primers¹	Sequenza dei Primers	Grandezza Prodotto	Temperatura Annealing
MSP	miR-132	M Fw	gaattaggcggttcgtttggatc	110bp	56°C
		M Rv	gaacgacaccaaaatctcgaacg		
		U Fw	tgggaattaggtggatttgttgattg	116bp	56°C
		U Rv	cccaaacaacaccaaatactcaaaca		
	miR-148a	M Fw	taggggaggtttcgttaaagc	117bp	57°C
		M Rv	cacgaaaacgaatattcgaaa		
		U Fw	ttggtaaaagttaaataattattga	115bp	50°C
	miR-18b	U Rv	caacaaaaaaactacaaaaatcaca		
		M Fw	agcgcggggatttcgtac	92bp	57°C
		M Rv	gaccccgaaacgctcg		
		U Fw	tggagagtgtggggattttgtatg	102bp	57°C
	miR-34b/c	U Rv	cacccaaccccaaaacactca		
		M Fw	ggttcgggtagttcgtagttttc	87bp	55°C
		M Rv	aacgctcgcgaaacaaactacg		
		U Fw	agaagatgttggtttgggtagttttagttttg	108bp	55°C
	miR-450a/ 542-3p	U Rv	cacttacaacaaactcacaaaacaaactaca		
		M Fw	tgggcgttttagagtaattaatatcgagac	92bp	57°C
		M Rv	cctcgtacccttaactttaccg		
		U Fw	ttgggtgttttagagtaattaattgagatg	100bp	57°C
		U Rv	tacactacctcatacccttaactttacca		
qPCR (quantificazione mRNA)	HB-EGF	Fw	ccacaccaaaacaaggaggagcac	209bp	60°C
		Rv	gcgattttccactgggaggc		
	Talin2	Fw	caagccacatcagacctcgtcaatg	101bp	60°C
		Rv	gctaagagttttgctgctgccagg		
PCR (amplificazione del <i>target</i> 3'UTR per il costrutto luc)	HB-EGF	Fw	ggcctctagatttgttgtgtgtttgtaaagtc	851bp	55°C
		Rv	ggcctctagaaaaatatgaaccaggtttggaaat		
	Talin2	Fw	ggcctctagaaggtgcgagcccagatggcgag	980bp	62°C
		Rv	ggcctctagaggcggttttgggttgaggacag		

¹M=Primers Metilati; U=Primers Non Metilati; Fw= primer forward ;Rv= primer reverse

PROFILO DI ESPRESSIONE DI miR-132 IN CAMPIONI CLINICI DAL DATASET TAYLOR

I campioni di cancro prostatico sono stati selezionati dal dataset di Taylor (Taylor *et al.*, 2010) disponibile al *GEO website* (GSE21032) dalla media del profilo di espressione di miR-132. La media delle due sonde è stata normalizzata con lo *z-score* ed è stata usata per valutare l'intensità nell'*heat map* dove il colore rosso corrisponde ad un'elevata espressione mentre il blu ad una bassa espressione. Sono stati analizzati 98 campioni con tumore primario e 13 metastatici. E' stato annotato lo sviluppo di metastasi e l'invasione ai linfonodi in un tempo superiore ai 5 anni. I campioni sono stati divisi in tre gruppi usando il *kmeans* (100 ripetizioni) rappresentando un elevato, intermedio e basso profilo di espressione di miR-132. In seguito è stata analizzata la media dei diversi campioni clinici.

Il *k-means* è un algoritmo partizionale che permette di suddividere gruppi di oggetti in *k* partizioni sulla base dei loro attributi. E' una variante dell'algoritmo di aspettazione-massimizzazione (EM) il cui obiettivo è di determinare *k* gruppi di dati generati da distribuzioni gaussiane.

Si assume che gli attributi degli oggetti possano essere rappresentati come vettori e che quindi formino uno spazio vettoriale.

L'obiettivo dell'algoritmo è di minimizzare la varianza *intra-cluster*. Ogni *cluster* viene identificato mediante un centroide o un punto medio. L'algoritmo segue una procedura iterativa. Inizialmente crea *k* partizioni e assegna ad ogni partizione i punti d'ingresso o casualmente o usando alcune informazioni euristiche. Quindi calcola il centroide di ogni gruppo. Costruisce così una nuova partizione associando ogni punto d'ingresso al *cluster* il cui centroide è più vicino ad esso.

Sulla base di questo, vengono ricalcolati i centroidi per i nuovi *cluster* e così via, finchè l'algoritmo converge.

METHYLATION ANALYSIS ED ESTRAZIONE DELL'RNA DA 74 CAMPIONI FFPE

I tessuti prostatici fissati in formalina e paraffina (FFPE) sono stati ottenuti dal Dipartimento di Anatomia Patologica del Policlinico Tor Vergata di Roma (Italy). Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad intervento chirurgico nello stesso istituto tra il 2005 ed il 2011. I campioni di PCa

(n=50) sono stati ottenuti da prostatectomia radicale. I tessuti con nessuna evidenza di PCa (n=24) sono stati ottenuti da tessuti normali circostanti dei casi di cancro (n=12) e di quelli con citoprostatectomia radicale (n=12).

La seguente tabella (Tab.3) schematizza i parametri demografici e clinico-patologici dei pazienti. Il DNA è stato estratto dai tessuti FFPE con *QiaAMP FFPE DNA tissue kit* (Qiagen). La conversione bisulfite e le reazioni MSP sono state eseguite come descritto per le linee cellulari. I prodotti MSP con una banda di intensità molto debole sono stati segnati rispettivamente nei campioni di controllo e nei campioni come positivo e negativo

Incidenza del Tumore Prostatico nei pazienti analizzati		
Età media (range)		63 (49-74)
Media del PSA (range)		5.95 (0.73-31) ng/mL
<i>Gleason Score</i> complessivo		
	6 - no. (%)	15 (30)
	7 - no. (%)	22 (44)
	8 - no. (%)	10 (20)
	9 - no. (%)	3 (6)
Dimensione Patologica del Tumore ¹		
	pT2a - no.(%)	1 (2)
	pT2b - no.(%)	2 (4)
	pT2c - no.(%)	28 (56)
	pT3a - no.(%)	11 (22)
	pT3b - no.(%)	7 (14)
	pT4 - no.(%)	1 (2)

¹Stadiazione determinata secondo: Sobin LH, Gospodariwicz M, Wittekind C (eds). TNM classification of malignant tumors. UICC International Union Against Cancer. 7th edn. Wiley-Blackwell, 2009 Dec; pp. 243-248.

Tabella 3. Incidenza del Tumore Prostatico nei pazienti analizzati

Per l'analisi di espressione di miR-132 nel pannello dei tessuti FFPE, l'RNA è stato estratto usando *RecoverAll total nucleic acid kit* (Ambion). I dati sono stati normalizzati in base alla media geometrica di miR-191 e miR-103 (vedi sotto RT-qPCR).

RETROTRASCRIZIONE E REAL TIME PCR (RT-qPCR)

La RT-qPCR di miR-132 presente nelle linee cellulari ed nei campioni umani implica un'iniziale ricerca appropriata di alcuni geni di riferimento attraverso diversi campioni rappresentativi e finalmente l'analisi di espressione di miR-132 normalizzato al valore di riferimento (Vandesompele *et al.*, 2002). *TaqMan miRNA assays* (Applied Biosystems) sono impiegati per misurare i livelli di espressione attraverso una reazione *RT multiplex*. 20µl di una reazione RT eseguita mediante *Taqman miRNA reverse transcription kit* (Applied Biosystems) contengono i seguenti reagenti : 0.4µl dNTP, 4µl trascrittasi inversa, 2µl RT Buffer 10X, 0.25µl inibitore delle RNasi, 20ng RNA e 4µl primer pool 5X. I *primer pool* consistono di *primers Taqman RT* ognuno diluito 1:4 da 250nM a 62.5nM.

16µl della reazione qPCR contiene *Taqman qPCR master mix 2X*, 0.4µl di *Taqman probe* e 3µl di cDNA diluito 5 volte.

Le curve standard sono state fatte per misurare l'efficienza di amplificazione da 90% a 110%. La qPCR è stata eseguita mediante lo strumento *Stratagene Mx3005P*. I dati sono stati importati nel qBase^{PLUS} (Biogazelle) per l'analisi con il *geNorm* (Vandesompele *et al.*, 2002) e la relativa quantificazione.

Per l'analisi di espressione dei *target*, l'RNA totale è stato retro-trascritto con il *ImProm-II Reverse Transcription System* (Promega) secondo le linee guida del manuale. 15µl della reazione di qPCR consiste in *Sybr green PCR master mix 2X* (Applied Biosystems), 10ng di cDNA e 0.4µM dei primers forward e reverse. Il valore geometrico di B-actina e B2M (primers ottenuti dal *Genorm kit* attraverso il programma *Primer design*) sono stati utilizzati per normalizzare i dati della qPCR. Le condizioni del programma del ciclo di amplificazione seguono le raccomandazioni del manuale (vedi Tab.2 per le sequenze dei primers).

EFFETTI BIOLOGICI DI miR-132 SULLE CELLULE PC3 (citometria a flusso, analisi della curva di crescita e della citotossicità)

Le cellule sono state trasfettate utilizzando il reagente *lipofectamina RNAiMax* (Invitrogen 13778-150) con gli scramble (ovvero: miR “a sequenza casuale”) del controllo negativo (Scr ctrl) o premiR-132 (Ambion) ad una concentrazione finale di 30nM. L'analisi quantitativa dei risultati della vitalità e della morte cellulare è stata determinata attraverso la misura citometrica della fluorescenza cellulare dopo la colorazione con la fluoresceina diacetato (fluoresceina DA) e ioduro

di propidio sul citometro a flusso *FacsCalibur* (Necton Dickinson) (Bartkowiak *et al.*, 1999). Le cellule sono state raccolte e colorate per 5 minuti con lo ioduro di propidio e la fluoresceina DA ad una concentrazione finale di 4 µg/ml e 100 mM rispettivamente.

L'analisi della curva di crescita è stata eseguita mediante la semina a bassa densità delle cellule PC3 in *piastre a 24 pozzetti*. Dopo 24h le trasfezioni sono state eseguite come descritto sopra. Le cellule sono state contate attraverso l'emocitometro usando il colorante *trypan blue* per distinguere le cellule vive da quelle morte. L'attività della lattato deidrogenasi (LDH) è stata misurata tramite il kit *LDH Flex Reagent Cartridge Dimension Vista* (Siemens, Washington, DC, USA; cat.no. RFK2053) usando lo strumento *Dimension Vista 1500* (Siemens).

IMMUNOBLOTTING

Le proteine totali sono state estratte dalle cellule usando il RIPA Buffer, separate su gel SDS-poliacrilamide e trasferite sulla membrana *Hybond PVDF* (GE Healthcare RPN303F). Le membrane sono state fissate per un'ora in 5% di latte in polvere senza grassi in T-PBS, incubate con anticorpi primari per 2h a temperatura ambiente, lavate ed ibridizzate con un anticorpo secondario perossidasi-coniugato per 1h (Biorad goat antirabbit 166-2408EDU oppure goat anti-mouse 170-6520). La rilevazione del segnale è stata eseguita con *ECL chemiluminescence kit* (Perkin Elmer NEL10500EA). Gli anticorpi utilizzati sono: anti-HBEGF (Abcam ab16783, diluito 1:125) anti-TALIN2 (Abcam ab108967, diluito 1:50000), anti-beta-actina (Sigma A5441, diluito 1:5000) e anti-PARP (Enzo Life Sciences; diluito 1:5000).

LUCIFERASI ASSAY E COSTRUTTI

L'attività luciferasica è stata misurata a 24h dopo cotrasfezione di *target* di miR-132 ai 3'UTRs (HB-EGF o TALIN2) in un costrutto di un gene *reporter* della luciferasi e di miR-132 nelle cellule HEK 293E. Le regioni 3'UTR dei *target* di miR-132 sono state amplificate mediante PCR dal DNA genomico umano usando le coppie dei *primers* riportate in Tab.2. I prodotti di PCR sono stati tagliati e ligati ad un vettore linearizzato di controllo, *XbaI-linearized pGL3Control vector* (Promega). Un totale di 2×10^5 cellule HEK 293E sono state seminate in *piastre a 12 pozzetti* 24 ore prima la trasfezione. 100ng di vettore pGL3 e 0.012ng di *scrambled* o premiR-132 sono stati cotrasfettati usando *Lipofectamine 2000* (Invitrogen). Per ricavare l'attività della luciferasi cellulare

essa è stata misurata 24h dopo la trasfezione usando il *Dual Luciferase Reporter Assay System* (Promega E1910); l'emissione luminosa è stata misurata dopo 10s usando il luminometro *Lumat LB9507* (EG&G Berthold). L'efficienza di trasfezione è stata normalizzata in base alla quantità delle proteine totali determinata dal saggio Bradford (*Bradford assaying*).

DATABASE BIOINFORMATICI

Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>) ed il sito bioinformatico *UCSC Genome Bioinformatics* (<http://genome.ucsc.edu/>) sono stati entrambi utilizzati per cercare *CpG islands* all'interno di 10KB a monte del microRNA candidato maturo come presunti siti di inizio della trascrizione e siti di legame di fattori di trascrizione (*Transcription Factor Binding Sites*). *Methgraph* è stato utilizzato per cercare regioni genomiche mirate usando l'*MSP primers* per analizzare la specificità dei primer stessi (Lefever *et al.*, 2010).

I siti *target* di miR-132 sul 3'UTR mirano geni predetti dal software *TargetScan5.1* disponibile al sito www.targetscan.org.

§ IV. RISULTATI

SCREENING DEI miRNAs EPIGENETICAMENTE SILENZIATI NEL PCa

Per identificare i miRNAs potenzialmente metilati nel PCa, sono state trattate le linee cellulari PrEC (cellule normali dell'epitelio prostatico), LNCaP, DU145 e PC3 (PCa metastasi linfonodali, cerebrali ed ossee, rispettivamente) con 3 μ M dell'inibitore delle metiltransferasi, l'AZA. Le cellule di controllo e quelle trattate sono state analizzate mediante il megaplex stemloop RT-qPCR per l'analisi di espressione di 650 miRNAs. E' stata effettuata un'accurata selezione secondo criteri illustrati nello schema in Figura 25.

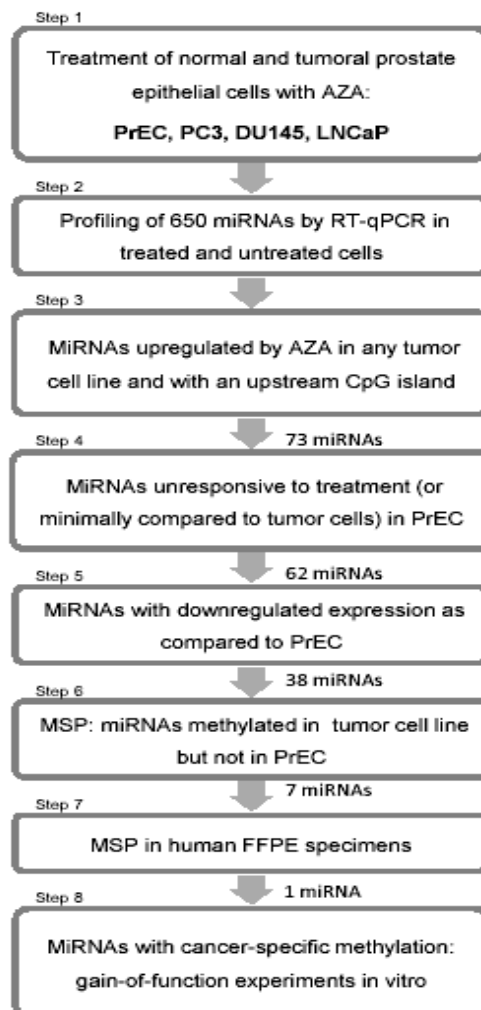


Figura 25. Schema di Lavoro: *screening* miRNA

Come mostrato nella Tabella 4, l'AZA aumenta l'espressione (minimo di 2 volte) di 82, 74, 99 e 66 miRNAs nelle cellule PrEC, LNCaP, DU145 e PC3, rispettivamente. Inizialmente l'attenzione è stata focalizzata su quei miRNAs *upregolati* nelle linee cellulari tumorali e raggruppati in *cluster* sullo stesso filamento dei miRNAs entro 10 kb l'uno dall'altro. Sono state ricercate accuratamente tramite il browser *Ensembl* le coordinate delle *CpG islands* 10 kb a monte del pre-miRNA, poiché gli studi computazionali hanno previsto che i promotori dei miRNA rientrino nell'ambito di questa distanza, con la maggior parte situate all'interno di 4 kb (Saini *et al.*, 2007).

Tabella 4. MiRNA con un'aumentata espressione (≥ 2 fold) dopo trattamento con 5-aza-2' deossicitidina nelle linee cellulari prostatiche.

PrEC		LNCaP		DU145		PC3	
miRNA	Fold Change ¹	miRNA	Fold Change	miRNA	Fold Change	miRNA	Fold Change
hsa-let7i*	2.42	hsa-let7-g*	<u>7.28</u>	hsa-mir-1	<u>14.95</u>	hsa-mir-107	2.61
hsa-mir-10b	4.45	hsa-let7i*	<u>3.78</u>	hsa-mir-106b*	2.03	hsa-mir-132	7.00
hsa-mir-132	2.79	hsa-mir-122	<u>14.11</u>	hsa-mir-107	2.26	hsa-mir-133a	5.55
hsa-mir-138	2.19	hsa-mir-127	<u>2.81</u>	hsa-mir-10a*	2.06	hsa-mir-138	3.24
hsa-mir-139-5p	4.91	hsa-mir-130a	<u>4.66</u>	hsa-mir-10b*	<u>25.43</u>	hsa-mir-141	<u>7.85</u>
hsa-mir-140-3p	2.47	hsa-mir-133a	<u>6.39</u>	hsa-mir-125b-1*	3.79	hsa-mir-142-3p	3.60
hsa-mir-142-3p	10.58	hsa-mir-142-3p	<u>3.23</u>	hsa-mir-127	<u>145.54</u>	hsa-mir-145	<u>374.53</u>
hsa-mir-145	15.21	hsa-mir-145	8.42	hsa-mir-132	4.31	hsa-mir-145*	<u>9.95</u>
hsa-mir-147b	<u>4.77</u>	hsa-mir-146a	5.21	hsa-mir-133a	8.88	hsa-mir-146a	2.16
hsa-mir-148b*	2.14	hsa-mir-150	3.24	hsa-mir-139-5p	3.38	hsa-mir-146b	2.58
hsa-mir-150	4.40	hsa-mir-15b*	<u>163.53</u>	hsa-mir-142-3p	36.25	hsa-mir-148a	2.71
hsa-mir-154*	3.44	hsa-mir-184	3.32	hsa-mir-145	<u>388.25</u>	hsa-mir-150	8.74
hsa-mir-181a	2.71	hsa-mir-18b	<u>217.27</u>	hsa-mir-145*	<u>6.38</u>	hsa-mir-152	2.05
hsa-mir-183*	2.11	hsa-mir-200c*	<u>107.84</u>	hsa-mir-146a	3.38	hsa-mir-155*	<u>3.43</u>
hsa-mir-190	3.61	hsa-mir-205	3.11	hsa-mir-150	24.17	hsa-mir-181a-2*	2.80
hsa-mir-190b	14.54	hsa-mir-211	<u>10.17</u>	hsa-mir-155	2.18	hsa-mir-181c	2.82
hsa-mir-192*	<u>5.78</u>	hsa-mir-212	<u>85.52</u>	hsa-mir-155*	2.22	hsa-mir-185	2.10
hsa-mir-193b*	2.15	hsa-mir-219-1-3p	<u>10.58</u>	hsa-mir-15b*	2.36	hsa-mir-193b	2.13
hsa-mir-199a-3p	<u>26.64</u>	hsa-mir-22	<u>383.92</u>	hsa-mir-17	2.14	hsa-mir-193b*	<u>42.21</u>
hsa-mir-203	2.87	hsa-mir-24-2*	<u>6.42</u>	hsa-mir-17*	<u>27.09</u>	hsa-mir-199a-3p	<u>128.35</u>
hsa-mir-21	2.37	hsa-mir-296	4.04	hsa-mir-184	4.46	hsa-mir-200c	7.50
hsa-mir-212	40.65	hsa-mir-29b-1*	<u>3.72</u>	hsa-mir-18a	2.87	hsa-mir-21	3.02

Tabella 4. Continuo

PrEC		LNCaP		DU145		PC3	
miRNA	Fold Change ¹	miRNA	Fold Change	miRNA	Fold Change	miRNA	Fold Change
hsa-mir-212	<u>8.13</u>	hsa-mir-330-5p	<u>5.85</u>	hsa-mir-18a*	3.97	hsa-mir-21*	2.19
hsa-mir-221*	8.57	hsa-mir-331-5p	<u>48.61</u>	hsa-mir-18b	<u>610.31</u>	hsa-mir-215	<u>15.99</u>
hsa-mir-222	2.14	hsa-mir-34c	10.58	hsa-mir-190	2.04	hsa-mir-217	<u>12.03</u>
hsa-mir-223	2.50	hsa-mir-361-3p	<u>41.19</u>	hsa-mir-192*	2.41	hsa-mir-219-1-3p	<u>10.76</u>
hsa-mir-23b	<u>30.66</u>	hsa-mir-363	<u>11.31</u>	hsa-mir-199a-3p	6.96	hsa-mir-23a*	2.49
hsa-mir-301b	3.05	hsa-mir-372	4.27	hsa-mir-19a	3.15	hsa-mir-296	7.31
hsa-mir-30a-5p	2.09	hsa-mir-375	6.10	hsa-mir-19b	2.15	hsa-mir-30a-3p	2.16
hsa-mir-30d	2.33	hsa-mir-376c	<u>2.72</u>	hsa-mir-19b-1*	3.11	hsa-mir-331-5p	<u>28.99</u>
hsa-mir-30e	2.25	hsa-mir-450a	2.97	hsa-mir-203	3.05	hsa-mir-335*	2.17
hsa-mir-34a	2.51	hsa-mir-455	2.73	hsa-mir-20a*	7.17	hsa-mir-33a*	<u>9.78</u>
hsa-mir-34b	3.17	hsa-mir-455-3p	<u>13.38</u>	hsa-mir-212	<u>404.21</u>	hsa-mir-34b	<u>66.84</u>
hsa-mir-34b	4.70	hsa-mir-491-3p	<u>4.35</u>	hsa-mir-217	<u>2.65</u>	hsa-mir-34c	<u>10.11</u>
hsa-mir-34c	3.90	hsa-mir-501-3p	<u>9.02</u>	hsa-mir-222*	2.17	hsa-mir-374a*	2.35
hsa-mir-362-3p	3.57	hsa-mir-502	4.43	hsa-mir-23a*	<u>15.23</u>	hsa-mir-375	2.55
hsa-mir-365	2.15	hsa-mir-504	<u>7.04</u>	hsa-mir-25*	<u>164.67</u>	hsa-mir-376a	2.01
hsa-mir-369-3p	<u>6.55</u>	hsa-mir-509-3p	<u>4.06</u>	hsa-mir-27a*	2.12	hsa-mir-376c	2.55
hsa-mir-372	<u>4.92</u>	hsa-mir-512-3p	12.14	hsa-mir-32	2.36	hsa-mir-409-3p	3.35
hsa-mir-374b*	<u>6.05</u>	hsa-mir-517a	<u>35.80</u>	hsa-mir-330	<u>49.81</u>	hsa-mir-411	3.65
hsa-mir-375	3.26	hsa-mir-517b	<u>3.66</u>	hsa-mir-367	<u>2.24</u>	hsa-mir-424*	2.40
hsa-mir-378	2.25	hsa-mir-517c	6.43	hsa-mir-372	<u>164.99</u>	hsa-mir-432	<u>11.09</u>
hsa-mir-382	<u>63.20</u>	hsa-mir-518e	<u>5.89</u>	hsa-mir-373	<u>27.87</u>	hsa-mir-449b	<u>25.70</u>
hsa-mir-409-3p	2.22	hsa-mir-518f	<u>3.03</u>	hsa-mir-375	2.71	hsa-mir-485-3p	<u>11.14</u>
hsa-mir-411	2.60	hsa-mir-519a	3.15	hsa-mir-376a	51.72	hsa-mir-487b	<u>4.23</u>
hsa-mir-432	3.09	hsa-mir-519b	5.43	hsa-mir-376c	32.01	hsa-mir-497	<u>57.41</u>
hsa-mir-450-5p	2.25	hsa-mir-519-3p	<u>10.36</u>	hsa-mir-409-3p	<u>37.57</u>	hsa-mir-503	2.13

Tabella 4. Continuo

PrEC		LNCaP		DU145		PC3	
miRNA	Fold Change ¹	miRNA	Fold Change	miRNA	Fold Change	miRNA	Fold Change
hsa-mir-483-5p	2.90	hsa-mir-525-3p	<u>6.43</u>	hsa-mir-410	<u>2.16</u>	hsa-mir-512-3p	<u>18.53</u>
hsa-mir-483-3p	2.44	hsa-mir-542-3p	<u>3.27</u>	hsa-mir-411	<u>13.00</u>	hsa-mir-517a	<u>24.42</u>
hsa-mir-487b	2.49	hsa-mir-548d	<u>2.76</u>	hsa-mir-449b	3.17	hsa-mir-517c	<u>12.88</u>
hsa-mir-492	<u>39.96</u>	hsa-mir-589	<u>13.81</u>	hsa-mir-455	2.84	hsa-mir-519a	<u>2.52</u>
hsa-mir-512-3p	<u>49.70</u>	hsa-mir-592	<u>3.73</u>	hsa-mir-483-5p	3.19	hsa-mir-519b	7.10
hsa-mir-513-3p	7.12	hsa-mir-615-5p	<u>5.81</u>	hsa-mir-485-3p	<u>37.49</u>	hsa-mir-548a	<u>4.41</u>
hsa-mir-516-3p	6.26	hsa-mir-616	<u>2.56</u>	hsa-mir-509-3p	<u>42.67</u>	hsa-mir-586	<u>6.83</u>
hsa-mir-517a	<u>2.04</u>	hsa-mir-641	<u>3.87</u>	hsa-mir-512-3p	<u>2804.69</u>	hsa-mir-606	<u>7.66</u>
hsa-mir-517c	<u>3.89</u>	hsa-mir-642	5.71	hsa-mir-512-5p	<u>51.63</u>	hsa-mir-616	4.79
hsa-mir-518b	<u>8.89</u>	hsa-mir-652	2.68	hsa-mir-515-3p	<u>117.99</u>	hsa-mir-628-5p	3.37
hsa-mir-518f	<u>2.90</u>	hsa-mir-708	<u>12.58</u>	hsa-mir-515-5p	<u>33.95</u>	hsa-mir-642	3.16
hsa-mir-519a	<u>2.42</u>	hsa-mir-886-3p	<u>293.18</u>	hsa-mir-516b	<u>34.85</u>	hsa-mir-651	<u>2.34</u>
hsa-mir-519b	<u>9.45</u>	hsa-mir-886-5p	<u>52.96</u>	hsa-mir-517a	<u>1120.97</u>	hsa-mir-652	2.05
hsa-mir-519e	<u>7.85</u>	hsa-mir-937	<u>3.90</u>	hsa-mir-517b	50.10	hsa-mir-708	<u>7.11</u>
hsa-mir-573	<u>14.71</u>			hsa-mir-517c	<u>606.25</u>	hsa-mir-886-3p	<u>519.10</u>
hsa-mir-581	<u>5.53</u>			hsa-mir-518a-3p	<u>25.60</u>	hsa-mir-886-5p	<u>58.53</u>
hsa-mir-589	<u>6.66</u>			hsa-mir-518b	<u>158.35</u>	hsa-mir-9*	2.04
hsa-mir-601	6.12			hsa-mir-518c	<u>5.37</u>	hsa-mir-935	2.46
hsa-mir-604	<u>4.72</u>			hsa-mir-518c*	<u>12.64</u>	hsa-mir-937	<u>5.18</u>
hsa-mir-610	2.97			hsa-mir-518d-5p	<u>82.96</u>		
hsa-mir-642	4.80			hsa-mir-518e	<u>254.94</u>		
hsa-mir-654-3p	<u>3.51</u>			hsa-mir-518f	37.00		
hsa-mir-655	2.09			hsa-mir-519a	<u>469.90</u>		
hsa-mir-656	4.09			hsa-mir-519b	<u>283.57</u>		
hsa-mir-766	3.66			hsa-mir-519b-3p	15.11		

Tabella 4. Continuo

PrEC		LNCaP		DU145		PC3	
miRNA	Fold Change ¹	miRNA	Fold Change	miRNA	Fold Change	miRNA	Fold Change
hsa-mir-768-3p	2.07	Not reported	N.A.	hsa-mir-519c	26.76	Not reported	N.A.
hsa-mir-875-5p	5.80			hsa-mir-519e	<u>8.28</u>		
hsa-mir-866-3p	2.30			hsa-mir-520a*	<u>16.84</u>		
hsa-mir-889	4.98			hsa-mir-520b	<u>6.22</u>		
hsa-mir-9	<u>17.68</u>			hsa-mir-520c-3p	2.21		
hsa-mir-9*	<u>18.95</u>			hsa-mir-520f	<u>3.32</u>		
hsa-mir-923	3.79			hsa-mir-520g	<u>55.03</u>		
hsa-mir-937	<u>2.34</u>			hsa-mir-520h	<u>48.38</u>		
hsa-mir-95	3.85			hsa-mir-522	<u>54.17</u>		
hsa-mir-99b*	2.04			hsa-mir-523	4.50		
				hsa-mir-524	<u>8.85</u>		
				hsa-mir-525-3p	<u>113.63</u>		
				hsa-mir-526b	<u>49.65</u>		
				hsa-mir-539	<u>21.61</u>		
				hsa-mir-548b-5p	2.14		
				hsa-mir-550	2.10		
				hsa-mir-550	<u>23.59</u>		
				hsa-mir-564	<u>36.94</u>		
				hsa-mir-636	2.77		
				hsa-mir-642	2.82		
				hsa-mir-655	<u>5.65</u>		
				hsa-mir-708	<u>9.54</u>		
				hsa-mir-848d-5p	3.97		
				hsa-mir-886-3p	2.43		
				hsa-mir-9*	2.18		
				hsa-mir-92a-1*	3.37		
				hsa-mir-941	2.28		

¹ I valori reattivi ai *Fold change* sottolineati sono valori minimi poiché le cellule di controllo a cui sono rapportati non mostrano alcuna espressione. I valori di Cq indeterminati sono stati settati a 35 per permettere ulteriori calcoli; N.A. = *not available*.

La Tabella di seguito illustrata (Tab.5) elenca i 73 miRNAs con a monte *CpG islands* di risposta all'AZA ed indica quelli eliminati da ulteriori analisi.

Tabella 5. Selezione e screening di candidati miRNA nelle linee cellulari tramite *Megaplex stemloop RT-PreAMP-qPCR*: miRNA upregulati dall'AZA ≥ 2 fold nelle linee tumorali ed aventi *CpG island* entro 10kb a monte del loro TSS.

Mature miR	Pre-miR	Pre-miR Coordinates [GRCh37]	Intronic/ Intergenic	AZA-responsive Cell Line
<i>let-7g</i> ^{*1}	<i>let-7g</i>	3: 52302294-52302377 [-]	intronic	LNCaP
<i>let-7i</i> *	<i>let-7i</i>	12: 62997466-62997549 [+]	intergenic	LNCaP
<i>miR-10a</i> *	<i>miR-10a</i>	17: 46657200-46657309 [-]	intergenic	DU145
<i>miR-106b</i> *	<i>miR-106b</i>	7: 99691616-99691697 [-]	intronic	LNCaP, DU145
<i>miR-127</i>	<i>miR-127</i>	14: 101349316-101349412 [+]	intronic	DU145, LNCaP
<i>miR-132</i>	<i>miR-132</i>	17: 1953202-1953302 [-]	intergenic	PC3, DU145 ³
<i>miR-146b-5p</i>	<i>miR-146b</i>	10: 104196269-104196341 [+]	intergenic	PC3
<i>miR-146b-3p</i>	<i>miR-146b</i>	10: 104196269-104196341 [+]	intergenic	LNCaP
<i>miR-148a</i>	<i>miR-148a</i>	7: 25989539-25989606 [-]	intergenic	PC3, DU145
<i>miR-15b</i> *	<i>miR-15b</i>	3: 160122376-160122473 [+]	intronic	DU145, LNCaP
miR-152²	miR-152	17: 46114527-46114613 [-]	intronic	PC3
<i>miR-17</i>	<i>miR-17</i>	13: 92002859-92002942 [+]	intronic	DU145
<i>miR-17</i> *	<i>miR-17</i>	13: 92002859-92002942 [+]	intronic	DU145
<i>miR-18a</i>	<i>miR-18a</i>	13: 92003005-92003075 [+]	intronic	DU145
<i>miR-18a</i> *	<i>miR-18a</i>	13: 92003005-92003075 [+]	intronic	DU145
<i>miR-18b</i>	<i>miR-18b</i>	X: 133304071-133304141 [-]	intergenic	DU145, LNCaP
<i>miR-19a</i>	<i>miR-19a</i>	13: 92003145-92003226 [+]	intronic	DU145
<i>miR-19a</i> *	<i>miR-19a</i>	13: 92003145-92003226 [+]	intergenic	LNCaP
<i>miR-19b</i>	<i>miR-19b-1</i>	13: 92003446-92003532 [+]	intronic	DU145
	<i>miR-19b-2</i>	X: 133303701-133303796 [-]	intergenic	
<i>miR-19b-1</i> *	<i>miR-19b-1</i>	13: 92003446-92003532 [+]	intronic	DU145
<i>miR-181c</i>	<i>miR-181c</i>	19: 13985513-13985622 [+]	intergenic	PC3
miR-193b	miR-193b	16: 14397824-14397906 [+]	intergenic	PC3
<i>miR-193b</i> *	<i>miR-193b</i>	16: 14397824-14397906 [+]	intergenic	PC3
<i>miR-199b-5p</i>	<i>miR-199b</i>	9: 131007000-131007109 [-]	intronic	LNCaP
miR-212	miR-212	17: 1953565-1953674 [-]	intergenic	DU145, LNCaP

<i>miR-219-1-3p</i>	<i>miR-219-1</i>	6: 33175612-33175721 [+]	<i>intergenic</i>	<i>PC3, LNCaP</i>
<i>miR-20a*</i>	<i>miR-20a</i>	13: 92003319-92003389 [+]	<i>intronic</i>	<i>DU145</i>
<i>miR-20b*</i>	<i>miR-20b</i>	X: 133303839-133303907 [-]	<i>intergenic</i>	<i>LNCaP</i>
miR-203	miR-203	14: 104583742-104583851 [+]	intergenic	DU145
<i>miR-22</i>	<i>miR-22</i>	17: 1617197-1617281 [-]	<i>intronic</i>	<i>LNCaP</i>
<i>miR-25*</i>	<i>miR-25</i>	7: 99691183-99691266 [-]	<i>intronic</i>	<i>DU145</i>
<i>miR-330-3p</i>	<i>miR-330</i>	19: 46142252-46142345 [-]	<i>intronic</i>	<i>DU145</i>
<i>miR-330-5p</i>	<i>miR-330</i>	19: 46142252-46142345 [-]	<i>intronic</i>	<i>LNCaP</i>
<i>miR-34b</i>	<i>miR-34b</i>	11: 111383663-111383746 [+]	<i>intergenic</i>	<i>PC3, LNCaP</i>
<i>miR-34c</i>	<i>miR-34c</i>	11: 111384164-111384240 [+]	<i>intergenic</i>	<i>PC3, LNCaP</i>
<i>miR-363</i>	<i>miR-363</i>	X: 133303408-133303482 [-]	<i>intergenic</i>	<i>LNCaP</i>
miR-375	miR-375	2: 219866367-219866430 [-]	intergenic	PC3, DU145, LNCaP
<i>miR-376a</i>	<i>miR-376a-1</i>	14: 101507119-101507186 [+]	<i>intergenic</i>	<i>PC3, DU145, LNCaP</i>
	<i>miR-376a-2</i>	14: 101506406-101506485 [+]	<i>intergenic</i>	
<i>miR-376c</i>	<i>miR-376c</i>	14: 101506027-101506092 [+]	<i>intergenic</i>	<i>DU145, LNCaP</i>
Tab.4.2.Continuo				
<i>miR-409-3p</i>	<i>miR-409</i>	14: 101531637-101531715 [+]	<i>intergenic</i>	<i>DU145, LNCaP</i>
<i>miR-410</i>	<i>miR-410</i>	14: 101532249-101532328 [+]	<i>intergenic</i>	<i>DU145</i>
<i>miR-411</i>	<i>miR-411</i>	14: 101489662-101489757 [+]	<i>intergenic</i>	<i>DU145, PC3</i>
<i>miR-432</i>	<i>miR-432</i>	14: 101350820-101350913 [+]	<i>intergenic</i>	<i>PC3</i>
<i>miR-432*</i>	<i>miR-432</i>	14: 101350820-101350913 [+]	<i>intergenic</i>	<i>LNCaP</i>
miR-449b	miR-449b	5: 54466474-54466570 [-]	intronic	PC3, DU145
<i>miR-485-3p</i>	<i>miR-485</i>	14: 101521756-101521828 [+]	<i>intergenic</i>	<i>PC3, DU145, LNCaP</i>
<i>miR-487b</i>	<i>miR-487b</i>	14: 101512792-101512875 [+]	<i>intergenic</i>	<i>PC3, LNCaP</i>
<i>miR-450a</i>	<i>miR-450a-1</i>	X: 133674371-133674461 [-]	<i>intergenic</i>	<i>LNCaP</i>
	<i>miR-450a-2</i>	X: 133674538-133674637 [-]		
<i>miR-497</i>	<i>miR-497</i>	17: 6921230-6921341 [-]	<i>intergenic</i>	<i>PC3</i>
miR-483-5p	miR-483	11: 2155364-2155439 [-]	Intronic	DU145
<i>miR-503</i>	<i>miR-503</i>	X: 133680358-133680428 [-]	<i>intergenic</i>	<i>PC3</i>
<i>miR-539</i>	<i>miR-539</i>	14: 101513658-101513735 [+]	<i>intergenic</i>	<i>DU145</i>
<i>miR-542-3p</i>	<i>miR-542</i>	X: 133675371-133675467 [-]	<i>intergenic</i>	<i>LNCaP</i>
<i>miR-542-5p</i>	<i>miR-542</i>	X: 133675371-133675467 [-]	<i>intergenic</i>	<i>LNCaP</i>
<i>miR-548b-5p</i>	<i>miR-548b</i>	6: 119390212-119390308 [-]	<i>intronic</i>	<i>DU145, LNCaP</i>
<i>miR-550</i>	<i>miR-550-1</i>	7: 30329410-30329506 [+]	<i>intronic</i>	<i>DU145, LNCaP</i>
	<i>miR-550-2</i>	7: 32772593-32772689 [+]	<i>intronic</i>	

<i>miR-564</i>	<i>miR-564</i>	3: 44903380-44903473 [+]	intronic	DU145
miR-589	miR-589	7: 5535450-5535548 [-]	intronic	LNCaP
<i>miR-615-5p</i>	<i>miR-615</i>	12: 54427734-54427829 [+]	intronic	LNCaP
miR-616	miR-616	12: 57912946-57913042 [-]	intronic	PC3, LNCaP
miR-627	miR-627	15: 42491768-42491864 [-]	intronic	LNCaP
<i>miR-636</i>	<i>miR-636</i>	17: 74732532-74732630 [-]	intronic	DU145
<i>miR-641</i>	<i>miR-641</i>	19: 40788450-40788548 [-]	intronic	LNCaP
<i>miR-642</i>	<i>miR-642</i>	19: 46178186-46178282 [+]	intronic	PC3, DU145, LNCaP
miR-655	miR-655	14: 101515887-101515983 [+]	intergenic	DU145, LNCaP
<i>miR-9*</i>	<i>miR-9-1</i>	1: 156390133-156390221 [-]	intronic	PC3, DU145
	<i>miR-9-2</i>	5: 87962671-87962757 [-]	intergenic	
	<i>miR-9-3</i>	15: 89911248-89911337 [+]	Intergenic	
<i>miR-935</i>	<i>miR-935</i>	19: 54485561-54485651 [+]	intronic	PC3
<i>miR-937</i>	<i>miR-937</i>	8: 144895127-144895212 [-]	intronic	PC3, LNCaP
miR-92a-1*	miR-92a-1	13: 92003568-92003645 [+]	intronic	DU145
<i>miR-941</i>	<i>miR-941-1</i>	20: 62550794-62550882 [+]	intronic	DU145
	<i>miR-941-2</i>	20: 62551101-62551189 [+]	intronic	
	<i>miR-941-3</i>	20: 62551213-62551301 [+]	intronic	

¹ MiRNA in corsivo – eliminati come candidati poiché la loro espressione nelle linee tumorali non trattate non diminuiva di almeno 2 volte rispetto alle cellule non trattate PrEC.

² MiRNA in grassetto – eliminati come candidati perchè il trattamento delle linee cellulari PrEC con l’AZA risulta aumentato di una volta più della metà di quello osservato per le linee cellulari tumorali date.

³ Analisi della metilazione del miR-132 è stata portata avanti solo per le linee PC3 dal momento che la sua espressione nelle DU145 non era diminuita di almeno 2 volte rispetto alle linee cellulari PrEC.

La metilazione può contribuire a regolare la funzione cellulare anche nel caso dei miRNAs (Weber *et al.*, 2007 and Sharma *et al.*, 2010). Sono state trattate le cellule PrEC con AZA per identificare miRNAs che non abbiano la metilazione cancro-specifica. Dei 73 miRNAs candidati nella Tabella 4.2, 11 miRNAs hanno una simile induzione nelle cellule PrEC trattate con AZA come comparato alle linee cellulari tumorali, quindi sono stati esclusi da ulteriori analisi.

Dal momento che la metilazione porta a severi controlli dell’espressione genica, i miRNAs che hanno la metilazione nelle linee cellulari di PCa potrebbero avere un più basso livello di espressione. Perciò sono stati analizzati i livelli di espressione basali nelle cellule PrEC e nelle linee

cellulari tumorali per 62 miRNAs di interesse. 38 di loro mostrano una diminuzione dei livelli di espressione di almeno due volte nelle linee cellulari tumorali. (Tab.5 e 6).

Tabella 6. 38 miRNAs selezionati per l'analisi della metilazione tramite MSP nelle linee cellulari prostatiche (tumorali e normali).

Cell line ¹	miRNA	CpG island analyzed [GRCh37] ²	Methylation Status ³
LNCaP	let-7i*	chr12:62996160-62997672	Unmethylated
DU145,LNCaP	miR-127	chr14:101349373-101349860	Methylated in DU145 and LNCaP but also in PrEC
PC3	miR-132	chr17:1952920-1962628	Methylated in PC3 but not in PrEC
PC3,DU145	miR-148a	chr7:25990013-25991320	Methylated in PC3 and DU145 but not in PrEC
DU145	miR-17	chr13:91999542-92001441	Unmethylated
DU145	miR-17*		
DU145	miR-18a		
DU145	miR-18a*		
DU145,LNCaP	miR-18b	chrX:133,306,235-133,306,327	Methylated in LNCaP. Both DU145 and PrEC unmethylated. ⁴
PC3	miR-193b*	chr16:14395605-14397075	Unmethylated
DU145	miR-19a	chr13:91999542-92001441	Unmethylated
DU145	miR-19b		
DU145	miR-19b-1*		
DU145	miR-20a*		
DU145	miR-330-3p	chr19:46144873-46145631	Methylated in DU145 and PrEC
PC3,LNCaP	miR-34b	chr11:111383136-111383892	Methylated in PC3 and LNCaP. Slight methylation in PrEC. ⁵
PC3,LNCaP	miR-34c		
PC3,DU145,LNCaP	miR-376a	chr14:101531644-101532384	Methylated in all cell lines including PrEC
DU145,LNCaP	miR-376c		
DU145,LNCaP	miR-409-3p		
DU145	miR-410		
DU145,PC3	miR-411		
PC3	miR-432	chr14:101349373-101349860	Methylated in PC3 and LNCaP but also in PrEC
LNCaP	miR-432*		
LNCaP	miR-450a	chrX:133683175-133685463	Methylated in LNCaP but not in PrEC
PC3,DU145,LNCaP	miR-485-3p	chr14:101531644-101532384	Methylated in all cell lines including PrEC
PC3,LNCaP	miR-487b		
DU145	miR-539		
LNCaP	miR-542-3p	chrX:133683175-133685463	Methylated in LNCaP but not in PrEC
DU145,LNCaP	miR-550	chr7:30323918-30325641	Unmethylated
LNCaP	miR-589	chr7:5539958-5541567	Methylated in LNCaP but also in PrEC
PC3,LNCaP	miR-616	chr12:57916323-57917029	Unmethylated
LNCaP	miR-627	chr15:42500161-42500561	Unmethylated
DU145,LNCaP	miR-655	chr14:101531644-101532384	Methylated in all cell lines including PrEC
DU145	miR-92a-1*	chr13:91999542-92001441	Unmethylated

¹Per un dato miRNA, corrisponde una linea cellulare AZA-dipendente, che porta ad una diminuzione di espressione basale rispetto alle PrEC

²Per CpG *islands* di grandi dimensioni, i primers per MSP sono stati disegnati su aree con un'elevata attività trascrizionale (factor/promoter activity) come determinato dall' UCSC *genome browser*

³Sequenze di primer disponibili su richiesta

⁴L'MSP in campioni clinici è stata portata avanti per il miR-18b nonostante la mancanza di metilazione nelle linee cellulari DU145

⁵L'MSP nei campioni clinici è stata portata avanti per il miR-34b/c nonostante la lieve metilazione trovata nelle linee cellulari PrEC

Utilizzando la tecnica *MSP*, è stato ricercato lo stato di metilazione di 20 *CpG islands* a monte dei 38 miRNA selezionati. L'*MSP* è stata effettuata nelle linee cellulari PrEC e nelle linee cellulari tumorali sensibili all'*AZA* con una diminuzione dei livelli di espressione dei miRNA stessi. La Tab.6 cataloga i 38 miRNA, le *CpG islands* considerate e i risultati dell'*MSP*. 15 miRNA hanno *CpG islands* non metilate mentre 13 miRNA le hanno metilate, ma la metilazione avviene anche nelle cellule PrEC. Questi 28 miRNA in seguito non sono stati considerati.

La Figura 26a-c illustra i livelli di espressione basali. La risposta all'*AZA* e i risultati dell'*MSP* di miR-132, miR-148a, miR-18b, miR-34b, miR-34c, miR-450a, e miR-542-3p rispetto alle PrEC. Le *CpG islands* a monte di questi miRNA sono metilate solamente nelle cellule tumorali di quelli di interesse e sono state analizzate *in vivo*, come descritto di seguito.

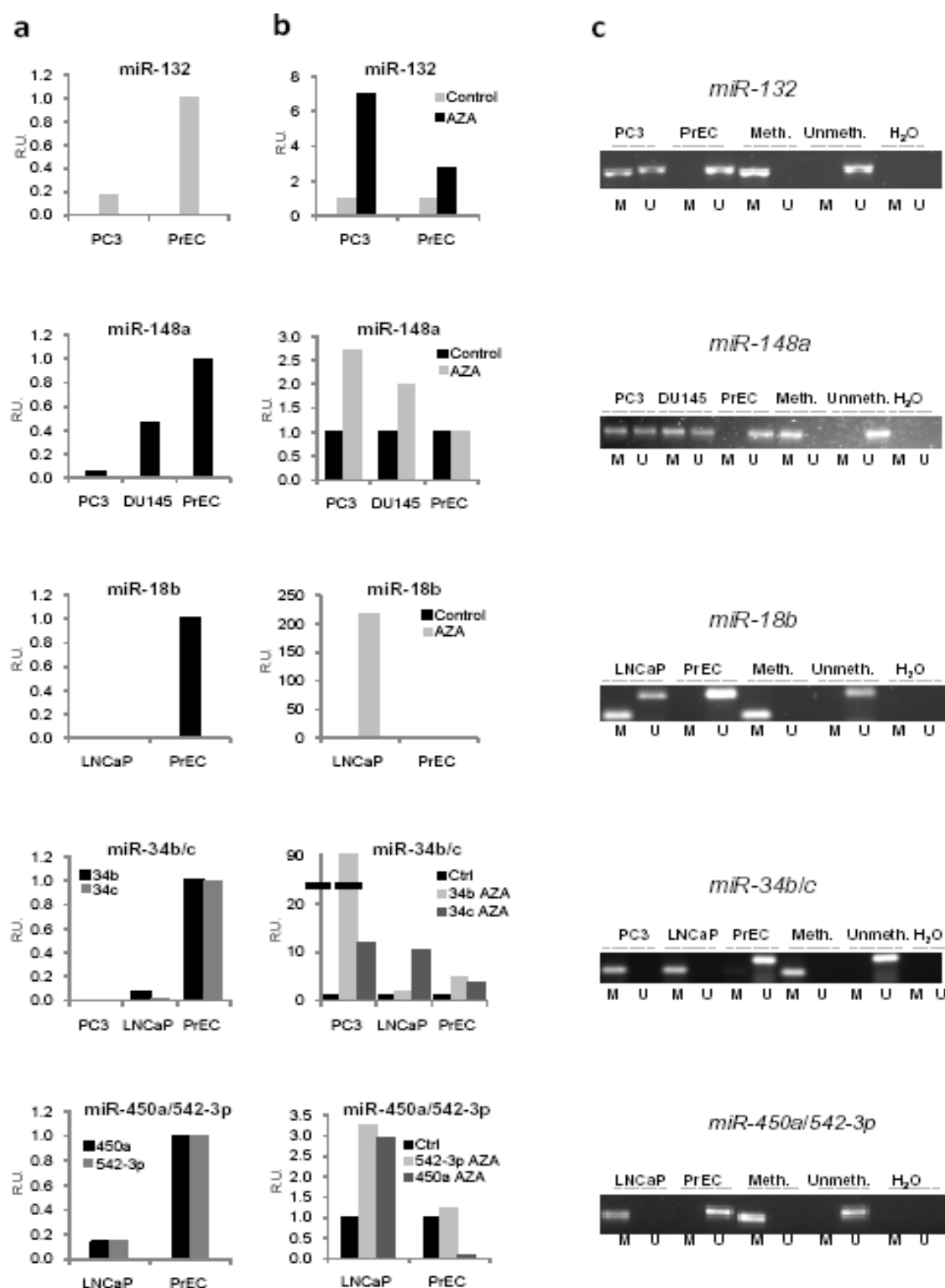


Figura 26. Identificazione dei miRNA metilati nelle linee cellulari di PCa trattate con il farmaco 5-aza-2'-deossicitidina (AZA) usando il *miRNAome megaplex stemloop RT-qPCR*.

A) I livelli di espressione basali dei miRNA rispetto alle PrEC (Settate a 1). B) La risposta all'AZA dei 7 miRNA metilati nel tumore ma non nelle cellule PrEC (step 6 nello schema di lavoro). Le cellule di controllo sono settate a 1. Le unità relative (R.U.) sono mostrate nell'asse y. C) Immagini del gel di agarosio dell'MSP delle *CpG islands* a monte dei 7 miRNA nelle cellule PrEC e nelle rispettive linee cellulari tumorali di risposta al trattamento con l'AZA.

Per studiare la rilevanza clinica della metilazione del promotore dei miRNA nel PCa, l'*MSP* è stata eseguita sulle *CpG islands* a monte del promotore di miR-132, miR-148a, miR-18b, miR-34b/c (*cluster*), miR-450a/542-3p (*cluster*), in 74 campioni clinici di prostata FFPE che comprendono 24 campioni normali (12 da cistoprostatectomia e 12 da tessuti normali circostanti il cancro prostatico) e 50 campioni di PCa da prostatectomia radicale. La metilazione avviene nel 0%, 5% e 13% dei tessuti tumorali per miR-18b, 148a, e 450/542-3p, rispettivamente (Tab.6).

I casi di controllo negativo non hanno mostrato alcuno stato di metilazione. La metilazione è stata scoperta nel 48% dei controlli e nell'87% di casi di cancro per il miR-34b/c. In questo caso, la frequenza di metilazione differisce tra i due gruppi di controllo: campioni cistoprostatectomici presentano metilazione nel 25% mentre il tessuto normale circostante la presenta per il 67%. Nei casi di tessuto normale circostante positivo per la metilazione (8 di 12) anche la controparte cancerosa era positiva. I quattro casi non metilati erano anche negativi in entrambi i tessuti tumorali.

Per quanto riguarda miR-132, l'*MSP* negli stessi campioni clinici ha individuato le seguenti frequenze di metilazione: 8% nel controllo e 42% nel cancro ($p=0.002$, secondo il test di Fisher). La specificità di questo risultato fornisce l'ipotesi di una relazione tra l'espressione di miR-132 e i parametri clinici, come sarà descritto di seguito.

L'ESPRESSIONE DI miR-132 E LA METILAZIONE DELLE *CpG ISLANDS* E' CORRELATA CON VARIABILI CLINICHE E PATOLOGICHE

L'espressione di miR-132 è stata analizzata in relazione ai vari parametri clinici usando il *dataset* GSE21032 (Taylor *et al.*, 2010) disponibile al *website* GEO. I dati di espressione di miR-132 sono disponibili per 111 tumori, compresi 13 metastatici. I livelli più bassi di miR-132 sono correlati con un'elevata incidenza di eventi metastatici e invasione linfonodale (Fig.27a-b).

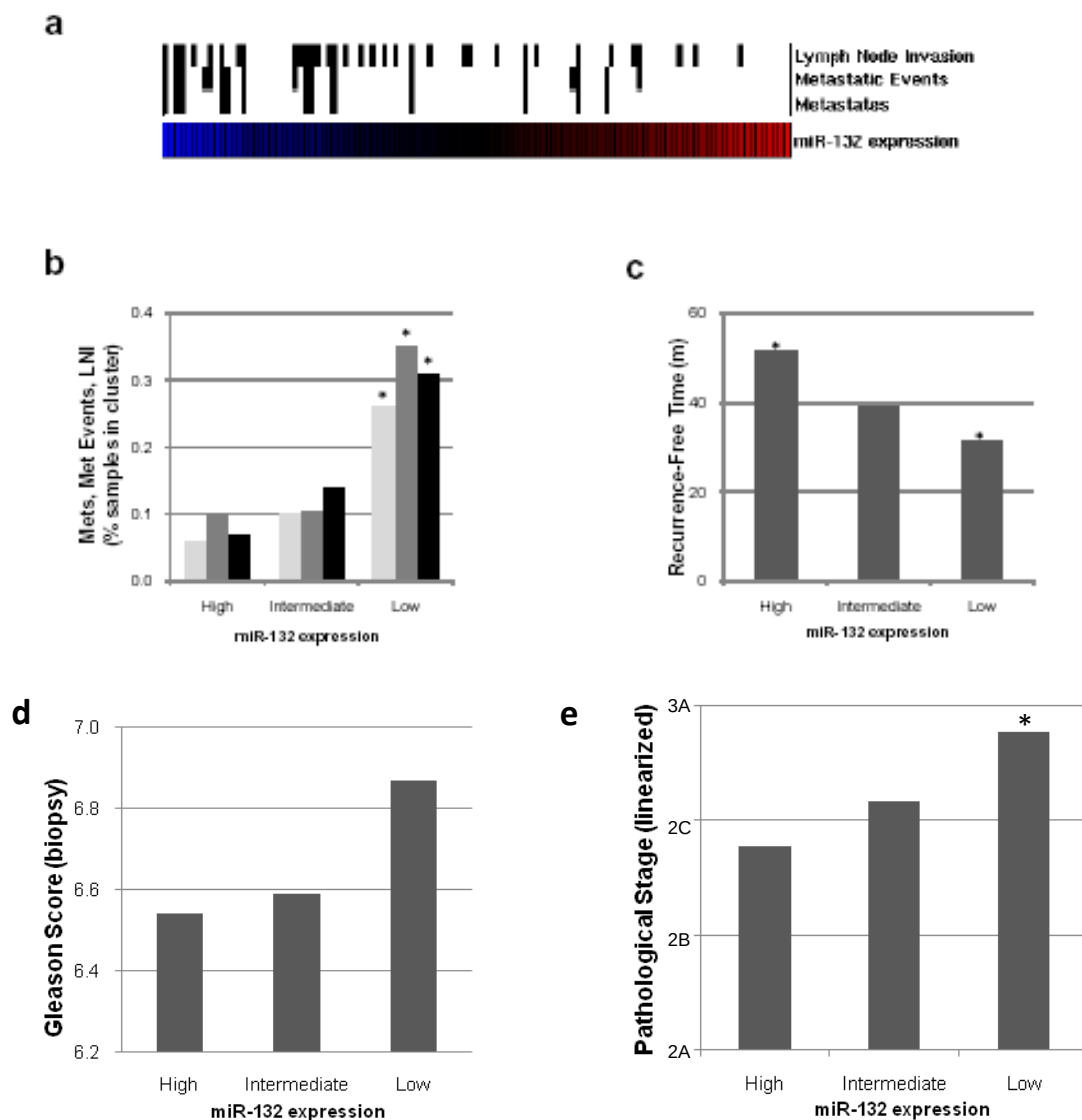


Figura 27. L'espressione del miR-132 è correlata con variabili cliniche in 111 campioni di cancro della prostata (Taylor dataset).

A) L'intensità nell' *heatmap* con il rosso corrispondente ad un elevato livello di espressione ed il blu ad un basso livello. (b-e) I campioni sono riuniti in *cluster* usando il *kmeans* (100 ripetizioni) che rappresenta un elevato, un intermedio ed un basso livello di espressione del miR-132. La media dei valori di diverse variabili cliniche sono significativamente alterate tra questi gruppi (* le colonne sopra indicano una significatività di $p < 0.05$). B) Campioni metastatici, eventi metastatici ed invasione ai linfonodi. C) *Recurrence-free time* biochimico dentro un periodo di osservazione di 5 anni. D) La media del *Gleason score* e E) la stadiazione determinata patologicamente (linearizzata come indicato sull'asse delle y).

Inoltre, i campioni con bassi livelli del miR-132 hanno significativamente ridotto il tempo di recidiva biochimica (Fig.27c).

Per recidiva biochimica si intende un innalzamento dei valori di PSA successivo a prostatectomia radicale, indice di una ripresa della crescita tumorale. Il fatto che miR-132 abbia ridotto il tempo di ricorrenza o recidiva biochimica significa che la probabilità di sviluppare una recidiva diminuisce con il tempo. In tale contesto, miR-132 potrebbe essere utilizzato dai clinici come marcatore prognostico e diagnostico nella recidiva prostatica.

Inoltre, è stata osservata una correlazione negativa tra i livelli di espressione di miR-132 e il *Gleason score* complessivo (Fig.27d), benché non statisticamente significativo, ed un'inversa correlazione della rilevanza statistica con la stadiazione del tumore (Fig.27e).

Questi risultati hanno suscitato l'interesse ad indagare i dati della metilazione nei pazienti analizzati, ipotizzando che i tessuti tumorali con un quantitativo più elevato di *Gleason score* totale (≥ 7) e/o con stadiazione patologica ($\geq pT3$) potrebbero avere un'elevata frequenza di metilazione, dal momento in cui queste caratteristiche patologiche sono correlate positivamente con l'invasività tumorale e la capacità metastatica. Difatti, abbiamo trovato una significativa correlazione tra la presenza della metilazione e la stadiazione tumorale patologica ($p=0.03$ secondo il test di Fisher-Freeman-Halton) come anche il *Gleason score* totale (<7 versus ≥ 7 ; $p=0.04$ secondo il test di Fisher). La Figura 28a mostra un esempio di risultato di *MSP* per i nostri quattro casi tipici. Le Figure 28a e 28b illustrano invece le frequenze di metilazione in funzione della stadiazione e del *Gleason score*.

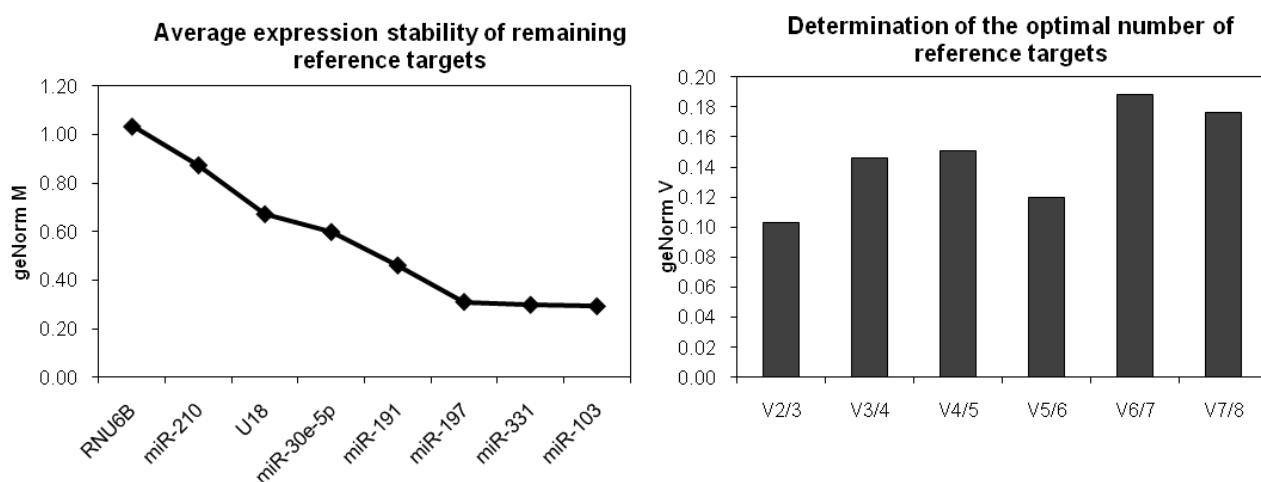
L'importanza di miR-132 nelle PCa come dimostrato dai risultati di seguito riportati nei campioni umani ci ha spinto a verificare i livelli di espressione di miR-132 nel nostro pannello di tessuti e nelle cellule PC3 e PrEC. Dopo aver stabilito i *geni housekeeping* di riferimento, il primo intento è stato quello di garantire un'elevata qualità dei dati (Guénin *et al.*, 2009). I candidati includono: RNU6B, U18, miR-210, miR-30a-5p, miR-191, miR-197, miR-331 e miR-103. Gli *small nucleolar RNA* (SnoRNA) sono piccole molecole di RNA coinvolte nella maturazione dell'RNA ribosomiale, favorendo modificazioni chimiche dell'RNA ribosomiale e dei trascritti di altri geni codificanti molecole di RNA. Tali modifiche (per lo più metilazione) aumentano l'attività dell'RNA maturo. Spesso sono codificati a partire da sequenze introniche delle proteine ribosomiali, a partire dal'RNA polimerasi II oppure possono essere trascritti indipendentemente come unità policistroniche. Per questo motivo sono stati utilizzati come geni di riferimento (*geni housekeeping*).

I miRNA 210, 30a-5p, 197 e 331 sono stati scelti per la loro elevata somiglianza al valore medio di espressione (in tutto il profilo genomico dei miRNA), come descritto da Mestdagh *et al.* (2009).

I miR-191 e miR-103 sono stati inclusi per la loro stabilità di espressione attraverso vari tipi di tessuti come descritto da Peltier e Lathman (2008). L'analisi di espressione di miR-132 condotta sul nostro pannello di tessuti ha rilevato una diminuzione dell'espressione ($p=0.02$) solo nei campioni tumorali metilati (Fig.28d) indicando la metilazione come la causa principale nell'aver bloccato l'espressione genica. Questi dati sono stati ottenuti dopo aver normalizzato il valore geometrico di miR-191 e miR-103, dimostrando di essere il miglior valore di riferimento come riportato in Fig.28e.

La Figura 29a raffigura l'analisi di geNorm mediante cellule di controllo e cellule trattate con AZA (PrEC, LNCaP, DU145 e PC3) suggerendo il valore geometrico di miR-331 e miR-103 come ottimo fattore di normalizzazione. La Figura 29b illustra invece l'espressione di miR-132 nelle PC3 e PrEC (basale e sensibile all'AZA) come convalidato su oltre tre replicati biologici con risultati simili ai nostri dati del megaplex RT-qPCR.

a



b

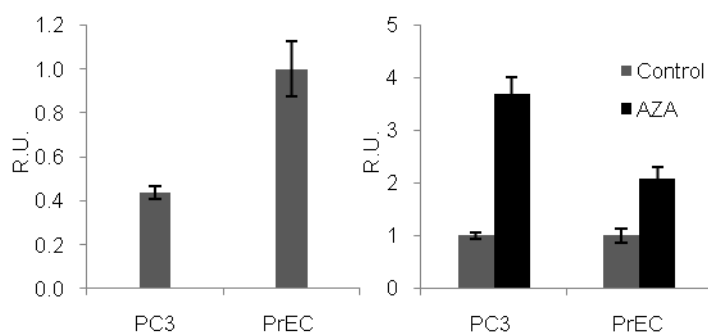


Figura 29. Validità dell'espressione di miR-132 nelle linee cellulari PC3.

A) Analisi tramite GeNorm dei geni candidati nelle linee cellulari PrEC, PC3, DU145 e LNCaP non trattate e trattate con AZA. B) Analisi di espressione nelle linee cellulari con una media di oltre 3 replicati biologici e normalizzati alla media geometrica del miR-331 e miR-103. A sinistra: PrEC settate ad 1. A Destra; Cellule non trattate settate ad 1. R.U. = *relative units* (unità corrispondente).

miR-132 EVOCA LA MORTE CELLULARE TRAMITE L'ANOIKIS

Per capire il ruolo biologico di miR-132 nel PCa, esso è stato reintrodotta nelle cellule PC3 utilizzando la trasfezione in transiente. 48h dopo la trasfezione, miR-132 trasfettato fa assumere alle cellule un fenotipo tondo paragonato alle cellule di controllo trasfettate con una sequenza *scramble*. A 72h, miR-132 trasfettato nelle cellule PC3 le rende meno confluenti rispetto al controllo, mentre molte galleggiano nel terreno (Fig.31a). A questo tempo non si verificano alcune perturbazioni del ciclo cellulare (Fig.30). Secondo quanto descritto da Galluzzi *et al.* (2009), è stata ricercata la presenza della morte cellulare attraverso due metodi distinti: l'assorbimento del *trypan blue* e l'attività della lattato deidrogenasi (LDH).

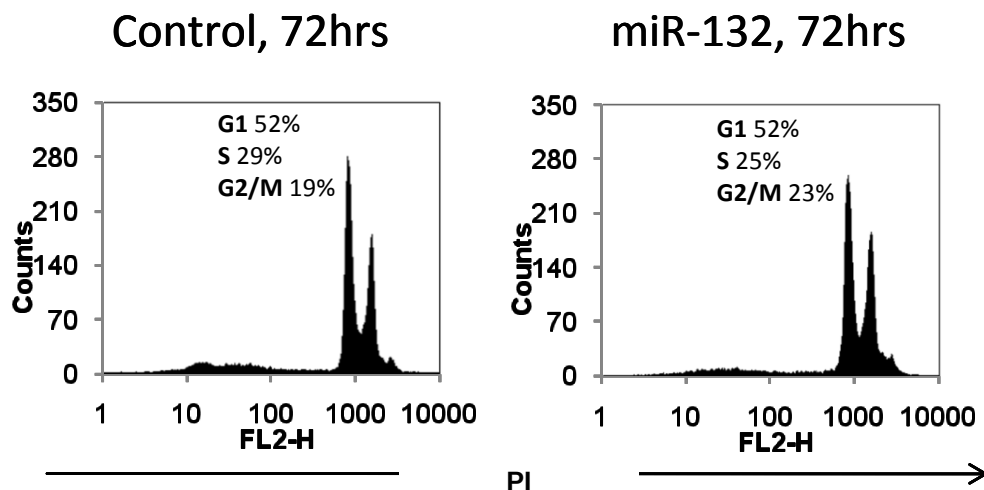


Figura 30. Analisi del ciclo cellulare delle linee cellulari PC3 trasfettate con le sequenze *scrambled* o premiR-132 a 72h.

Risultati simili sono stati ottenuti a 48h dalla trasfezione (dati non mostrati).

La vitalità cellulare, attraverso l'analisi della curva di crescita con il *saggio trypan blue*, è diminuita a 20% ($p=0.04$) e 40% ($p=0.02$) per cellule esprimenti miR-132 a 96h e 144h, rispettivamente (Fig.31b). L'attività dell'enzima LDH è leggermente aumentata ($p=0.04$) per le cellule trasfettate con miR-132 all'inizio a 72h (Fig.31c). A 96h, l'attività dell'LDH di miR-132 è raddoppiata ($p=0.03$) nel terreno rispetto al controllo.

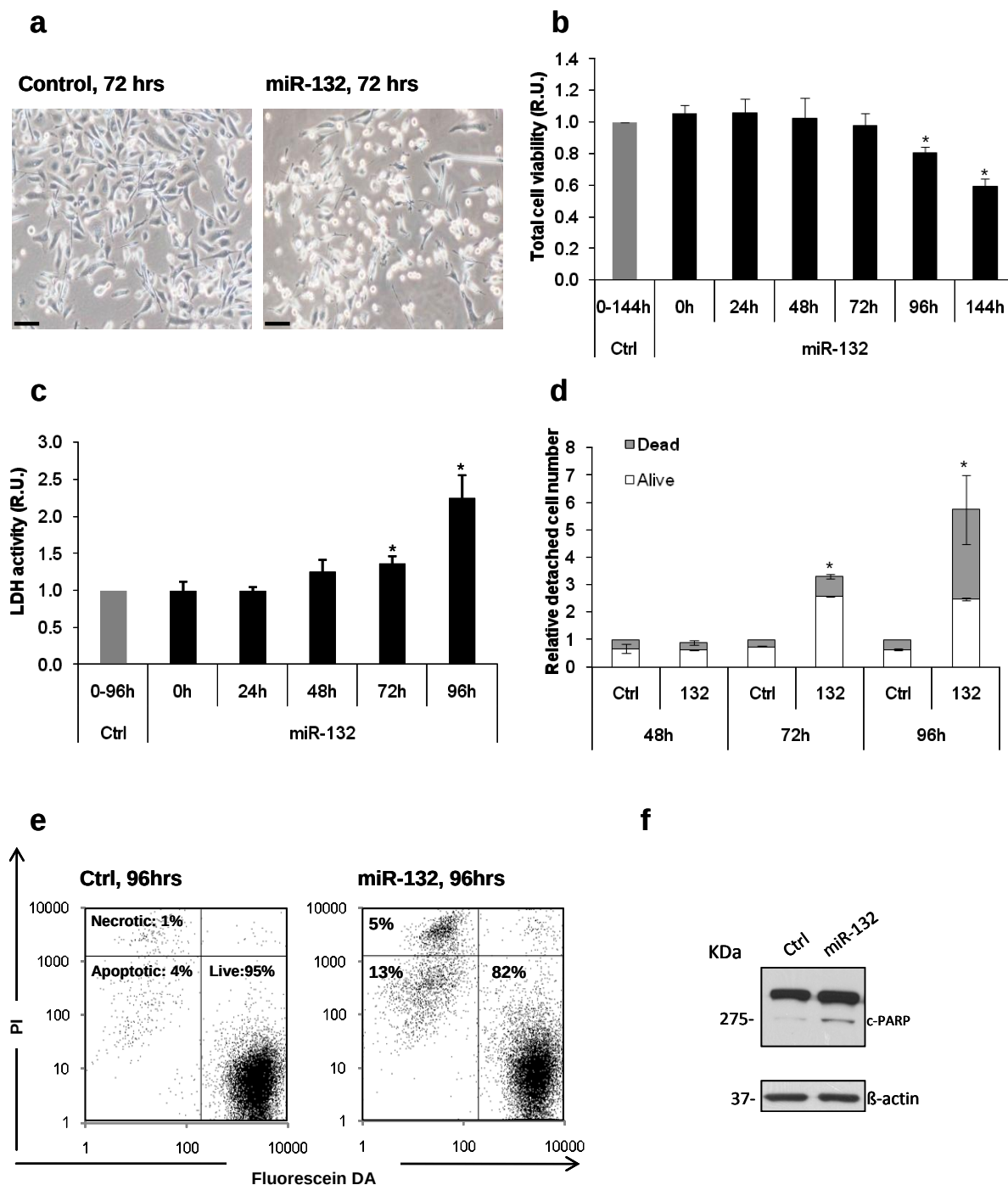


Figura 31. L'espressione successiva di miR-132 nelle cellule PC3 induce il distacco seguito dalla morte cellulare.
A) Immagine al microscopio fase di contrasto delle cellule PC3 a 72h dopo la trasfezione con all'interno la sequenza di controllo negativo, *scrambled* (Ctrl) o premiR-132. Lunghezza della barra nera =75μM. B) Vitalità cellulare tempo-dipendente delle cellule esprimenti miR-132 rispetto al controllo (settato ad 1 in tutto il tempo) come determinato dalla curva di crescita. L'asse delle x mostra il numero di ore dalla trasfezione. C) Attività LDH nel terreno di coltura delle cellule trasfettate con il premiR-132 rispetto alle cellule di controllo (settate ad 1) a tempi indicati (0h= giorno della trasfezione). D) Numero di cellule distaccate (vive e morte) di cellule esprimenti miR-132 rispetto al controllo (settato ad 1) a differenti tempi dalla trasfezione. E) Analisi quantitativa della vitalità cellulare e della morte tramite citometria a flusso che misura la fluorescenza cellulare dopo colorazione con la fluoresceina diacetato e lo ioduro di propidio. Tutti i dati (c-d-e) rappresentano il risultato di almeno tre esperimenti indipendenti. F) Il Western blot illustra il taglio di PARP nelle cellule trasfettate a 96h dopo la trasfezione.

E' stata quindi fatta una discriminazione tra cellule attaccate e cellule galleggianti nell' analisi della curva di crescita. La Figura 31d mostra l'effetto di miR-132 sulla vitalità delle cellule staccate in funzione del tempo. E' stato rilevato un aumento di tre volte per le cellule trasfettate con miR-132 a 72h. A 96h, questo aumento è di quasi sei volte, con approssimativamente metà delle cellule che galleggiano ed assorbono il *trypan blue*.

In seguito, si è cercato di spiegare qual è il meccanismo di base della morte cellulare. In questo caso, è stata usata la citometria a flusso per quantificare il numero di cellule vive, in apoptosi ed in necrosi a 72h e a 96h dopo trasfezione con il saggio fluoresceina-diacetato (*fluorescein DA*) e lo ioduro di propidio (PI) (Bartkowiak et al., 1999). A 72h la percentuale di cellule vive non differisce tra cellule di controllo e cellule trasfettate con il miR-132. Come mostrato in Fig.31e, il rapporto tra cellule in apoptosi ed in necrosi è di tre e quattro volte più elevato nelle cellule trasfettate con miR-132 a 96h. Il taglio di PARP a 96h (Fig.31f) è un'ulteriore evidenza della presenza dell'apoptosi.

HB-EGF E TALIN2 SONO I TARGET DIRETTI DI miR-132

La funzione di soppressore tumorale di miR-132 mediata dal distacco cellulare e dalla seguente morte ha suggerito la presenza di *target* implicati nell'aderenza cellulare. Come illustrato in Tabella 7 l'analisi dell'espressione di miR-132 e del *KEGG-pathway* suggerisce che questo miRNA è coinvolto nell'adesione cellulare come pure nei vari *pathway* associati all'inizio e progressione del tumore.

Tabella 7. Correlazione tra l'espressione del miR-132 con il *KEGG-pathway signature*.

Correlazione tra l'espressione del miR-132 e il <i>KEGG-pathway signature</i> . I <i>Signature score</i> per tutti i <i>KEGG pathway signature</i> sono stati calcolati usando il <i>GSEA</i> . La correlazione di Pearson è stata calcolata tra l'espressione del miR-132 e i <i>signature score</i> . Sono identificati molti <i>signature</i> significativi con una correlazione positiva e negativa.		
<i>Signature score</i> correlati Positivamente	Corr	P-Value
KEGG_NOD_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	0,501606	<1.00E-006
KEGG_COMPLEMENT_AND_COAGULATION_CASCADES	0,492797	<1.00E-006
KEGG_ETHER_LIPID_METABOLISM	0,492684	<1.00E-006
KEGG_LEISHMANIA_INFECTION	0,474828	<1.00E-006
KEGG_TOLL_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	0,455914	<1.00E-006
KEGG_TYPE_I_DIABETES_MELLITUS	0,454843	1,00E-006
KEGG_ALLOGRAFT_REJECTION	0,454012	1,00E-006
KEGG_VIRAL_MYOCARDITIS	0,442214	1,00E-006
KEGG_CELL_ADHESION_MOLECULES_CAMS	0,438574	1,00E-006
KEGG_ECM_RECEPTOR_INTERACTION	0,437291	2,00E-006
KEGG_GRAFT_VERSUS_HOST_DISEASE	0,435287	2,00E-006
KEGG_APOPTOSIS	0,417586	5,00E-006
KEGG_ANTIGEN_PROCESSING_AND_PRESENTATION	0,41348	6,00E-006
KEGG_T_CELL_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	0,407182	9,00E-006
KEGG_CHEMOKINE_SIGNALING_PATHWAY	0,405862	1,00E-005
KEGG_SMALL_CELL_LUNG_CANCER	0,396691	1,60E-005
KEGG_PATHWAYS_IN_CANCER	0,383314	3,30E-005
KEGG_PROXIMAL_TUBULE_BICARBONATE_RECLAMATION	0,380815	3,70E-005
KEGG_AUTOIMMUNE_THYROID_DISEASE	0,369426	6,60E-005
KEGG_FOCAL_ADHESION	0,368967	6,80E-005
KEGG_B_CELL_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	0,365305	8,10E-005
KEGG_LEUKOCYTE_TRANSENDOTHELIAL_MIGRATION	0,363127	9,00E-005
KEGG_CYTOSOLIC_DNA_SENSING_PATHWAY	0,358745	1,10E-004
KEGG_REGULATION_OF_ACTIN_CYTOSKELETON	0,357699	1,16E-004
KEGG_PATHOGENIC_ESCHERICHIA_COLI_INFECTION	0,357168	1,19E-004
KEGG_P53_SIGNALING_PATHWAY	0,346525	1,95E-004
KEGG_ASTHMA	0,331756	3,75E-004
KEGG_DORSO_VENTRAL_AXIS_FORMATION	0,330184	4,01E-004
KEGG_ALDOSTERONE_REGULATED_SODIUM_REABSORPTION	0,322053	5,67E-004
KEGG_MAPK_SIGNALING_PATHWAY	0,32185	5,72E-004
KEGG_HYPERTROPHIC_CARDIOMYOPATHY_HCM	0,320468	6,06E-004
KEGG_FC_GAMMA_R_MEDIATED_PHAGOCYTOSIS	0,31506	7,57E-004

KEGG_INTESTINAL_IMMUNE_NETWORK_FOR_IGA_PRODUCTION	0,309811	9,37E-004
KEGG_ARRHYTHMOGENIC_RIGHT_VENTRICULAR_CARDIOMYOPATHY_ARVC	0,308778	9,76E-004
KEGG_TGF_BETA_SIGNALING_PATHWAY	0,307997	1,01E-003
KEGG_CIRCADIAN_RHYTHM_MAMMAL	0,304723	1,15E-003
KEGG_DILATED_CARDIOMYOPATHY	0,298962	1,44E-003
Tab. 5 continuo		
KEGG_MELANOMA	0,297762	1,50E-003
KEGG_FC_EPSILON_RI_SIGNALING_PATHWAY	0,29704	1,55E-003
KEGG_NATURAL_KILLER_CELL_MEDIATED_CYTOTOXICITY	0,296644	1,57E-003
KEGG_AXON_GUIDANCE	0,294799	1,69E-003
KEGG_RIG_I LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	0,293636	1,76E-003
KEGG_PHOSPHATIDYLINOSITOL_SIGNALING_SYSTEM	0,285208	2,41E-003
KEGG_ACUTE_MYELOID_LEUKEMIA	0,282973	2,62E-003
KEGG_O_GLYCAN_BIOSYNTHESIS	0,28129	2,78E-003
KEGG_CHRONIC_MYELOID_LEUKEMIA	0,278654	3,06E-003
KEGG_GAP_JUNCTION	0,265062	4,93E-003
KEGG_TRYPTOPHAN_METABOLISM	0,264958	4,95E-003
KEGG_ADIPOCYTOKINE_SIGNALING_PATHWAY	0,260384	5,78E-003
KEGG_PROSTATE_CANCER	0,257205	6,43E-003
KEGG_COLORECTAL_CANCER	0,249646	8,23E-003
KEGG_VASCULAR_SMOOTH_MUSCLE_CONTRACTION	0,249611	8,24E-003
Signature score correlati Negativamente	Corr	P-Value
KEGG_TYROSINE_METABOLISM	0,310207	9,22E-004
KEGG_HOMOLOGOUS_RECOMBINATION	0,297452	1,52E-003
KEGG_LINOLEIC_ACID_METABOLISM	0,281852	2,73E-003
KEGG_DRUG_METABOLISM_OTHER_ENZYMES	-0,27571	3,40E-003
KEGG_RETINOL_METABOLISM	0,257624	6,34E-003

Per rimanere all'interno del contesto di miR-132 indotto dall'*anoikis*, è stato utilizzato il *TargetScan5.1 software* per cercare presunti *target* coinvolti nell'adesione cellulare. Abbiamo trovato che l'mRNA di HB-EGF possiede tre presunti target localizzati nel suo 3'-UTR (Fig.32c). HB-EGF funziona come oncogene, con un ruolo pilota nella sopravvivenza, adesione cellulare, angiogenesi e tumorigenicità (Miyamoto *et al.*, 2007). HB-EGF ha un' aumentata espressione nelle linee cellulari di PCa androgeno-indipendenti e contribuisce al passaggio dallo stato androgeno-dipendente a quello androgeno-indipendente (Tørring *et al.*, 2000; Adam *et al.*, 2002).

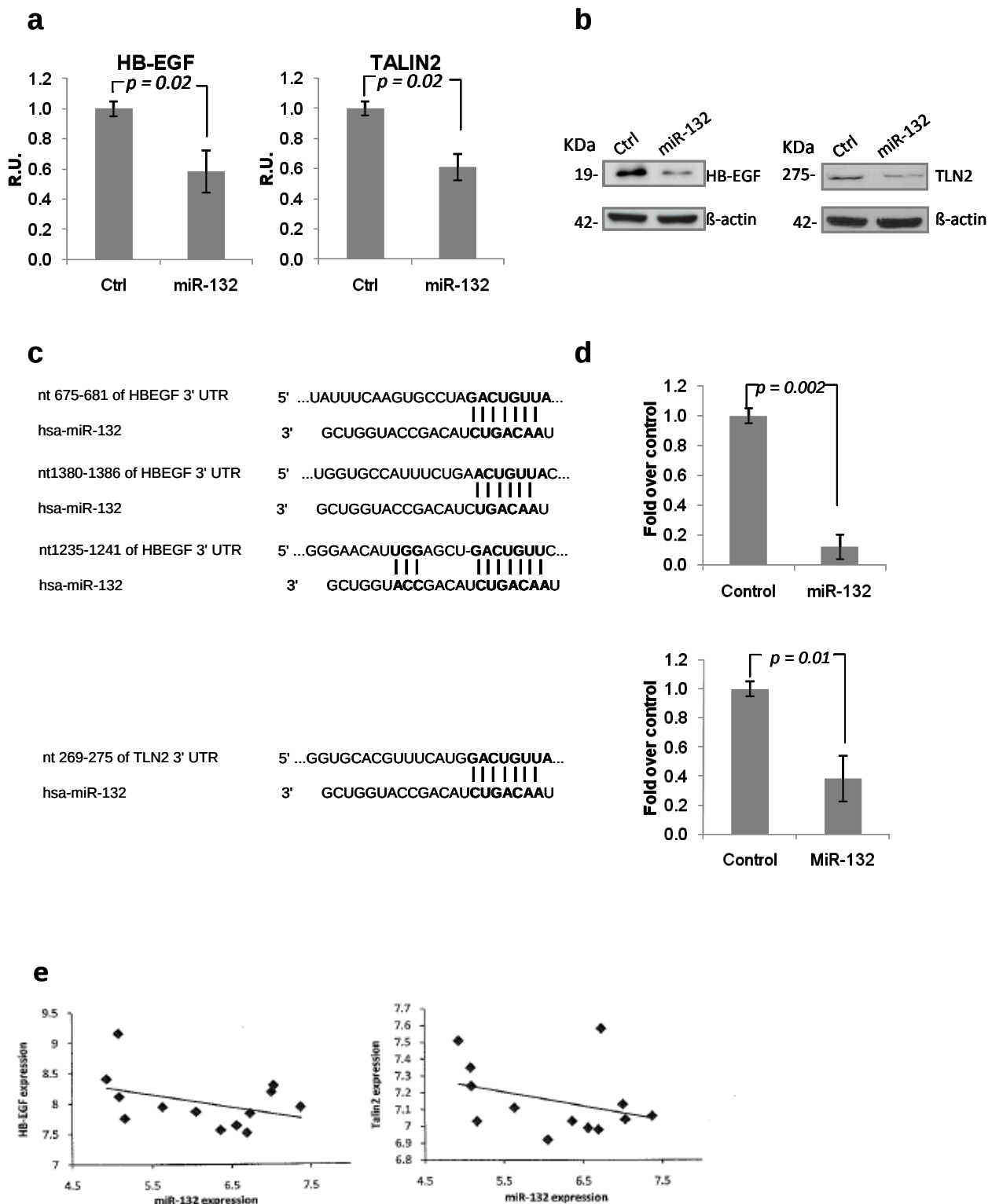


Figura 32. HB-EGF e TALIN2 target del miR-132 nelle cellule PC3.

A) Livelli di espressione di *HB-EGF* e di *TALIN2* nel controllo (Ctrl) e nelle cellule che esprimono il miR-132 tramite RT-qPCR. B) Livelli di espressione proteica di *HB-EGF* e *TALIN2* a 72h dopo la trasfezione tramite western blotting. C) Siti target predetti del miR-132 su *HB-EGF* e *TALIN2* come dato dal *TargetScan5.1*. D) Inserimento del target del miR-132 all'estremità 3-UTR nel *gene reporter* della luciferasi comporta una diminuzione dell'attività realtiva alla luciferasi in presenza del miR-132 nelle cellule HEK293E 24h dopo la co-trasfezione. E) Correlazione tra l'*HB-EGF* (sinistra), *Talin2* (destra) e l'espressione del miR-132 nei casi metastatici di PCa ricavati dal *Taylor dataset*.

Nello stesso modo, abbiamo identificato nel 3'-UTR di *TLN2* un presunto sito *target* conservato di miR-132. Le proteine *Talin* collegano le integrine all'actina del citoscheletro e consistono in due differenti geni, *talin1* e *talin2*, dei quali diversi contributi di adesione cellulare non sono pienamente descritti (Monkley *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2008). Uno studio recente molto interessante sottolinea il ruolo di *Talin1* nell'adesione cellulare e nella resistenza all'*anoikis* nel PCa (Sakamoto *et al.*, 2010).

E' stato analizzato l'mRNA e l'espressione proteica di entrambi i bersagli nelle cellule PC3 trasfettate con la sequenza *scrambled* o premiR-132 attraverso RT-qPCR e Western Blotting, trovando un'elevata quantità di mRNA per entrambi i geni (qPCR *Cq value* sotto i 27 cicli). L'introduzione di miR-132 diminuisce l'espressione dell'mRNA di entrambi *HB-EGF* e *TALIN2* di circa 40% (Fig.32a). L'analisi tramite Western Blotting ha confermato una significativa riduzione dei livelli proteici (Fig.32b)

Per dimostrare che *HB-EGF* e *TLN2* sono bersagli diretti di miR-132, sono state clonate le sequenze umane del loro 3'UTR a valle del *gene reporter* della luciferasi, e sono stati trasfettati i vettori risultanti in presenza di miR-132 oppure nella sequenza di controllo *scrambled*. miR-132 ha indotto l'attività della luciferasi per integrarsi nel genoma dell'ospite, in particolare nelle sequenze ospiti di entrambi i vettori, a livello del 3'-UTR di *HB-EGF* e *TLN2*, con circa il 90% di inibizione per il primo e il 40% per il secondo, sostenendo perciò le precedenti ipotesi.

Data l'importanza dell'aderenza nella metastasi del PCa, è stato usato nuovamente il *dataset* di Taylor, ipotizzando che potrebbe esistere una contraria correlazione tra i livelli di miR-132 e l'espressione *HB-EGF/Talin2* nei campioni di PCa con gli eventi metastatici. La Figura 32e illustra il rapporto ipotizzato, ma senza un significato statistico.

§ V. DISCUSSIONE

IL TRATTAMENTO CON AZA DELLE CELLULE PCa RIVELA UNA CERTA QUANTITA' DI DATI INFORMATIVI

Il progetto mira ad identificare miRNA silenziati dalla metilazione nella regione del promotore dell'isola CpG nel PCa. Tale strategia prevede un trattamento farmacologico che segue un approccio genomico nelle linee cellulari di cancro della prostata derivate da metastasi umane nella regione dei linfonodi (LNCaP), del cervello (DU145) e dell'osso (PC3). Le metodiche successive hanno seguito il principio cardine dello studio, ma le loro limitazioni giustificano gli studi successivi sull'epigenetica dei miRNA nel PCa, dal momento che la metilazione inibisce l'espressione dei miRNA in questo tipo di tumore e, quasi certamente, dovranno essere scoperti.

La scelta delle linee cellulari usate per limitare la tumorigenesi della prostata nell'uomo rimane la prima sfida nel disegnare un'appropriata metodologia per lo *screening* epigenetico. Altri studi hanno impiegato un largo numero di linee cellulari in modo tale da permettere l'analisi di significatività statistica. Per esempio Kozaki *et al.* (2008) ha impiegato più di 10 linee cellulari con l'intento di cercare miRNA epigeneticamente silenziati nei tumori del cavo orale stabilendo un metodo per calcolare le frequenze per i miRNA la cui espressione è diminuita da una linea cellulare normale di cheratinociti e per quelli la cui espressione è aumentata con l'AZA. Per esempio, può essere determinata la "marcatura" della metilazione dei miRNA indice della presenza di cancro, piuttosto che tumori di una particolare aggressività. Stranamente poche linee cellulari sono commercialmente disponibili per il PCa in paragone ad altri tipi di tumore. I tre usati in questo studio rappresentano quelle classiche più descritte in letteratura. L'uso di linee cellulari metastatiche ha i propri limiti per le informazioni univoche molecolari disponibili nelle linee tumorali distaccate dal loro sito di origine. La maggioranza degli aspetti interessanti in qualche cellula tumorale potrebbe essere correlato alla loro aggressività. Pertanto gli studi futuri dovranno ancora ricercare miRNA silenziati dalla metilazione coinvolti nell'inizio del cancro della prostata e questo potrebbe essere fatto studiando le linee cellulari primarie derivate dai tumori con bassa stadiazione e *Gleason score*, oppure cercando *patterns* di metilazione dei miRNA in funzione dell'età del paziente.

La scelta di agenti demetilanti rappresenta un'ulteriore complicazione nella modalità di *screening* dei geni epigeneticamente regolati. L'analisi della letteratura rivela l'uso ubiquitario dell'AZA, come impiegato qui, ma anche l'utilizzo degli inibitori delle HDAC come la tricostatina A o anche la combinazione di entrambi (Hoebeeck *et al.*, 2008; Vincent *et al.*, 2011; Shao *et al.*, 2011). E' stato utilizzato l'AZA per cercare miRNA silenziati attraverso la metilazione del promotore, e quelli non bloccati dalla deacetilazione degli istoni per cui la tricostatina A avrebbe contribuito al loro rilascio. Quindi future ricerche saranno necessarie per identificare i miRNA coinvolti nei meccanismi epigenetici diversi dalla metilazione nel PCa.

Nonostante l'effetto dell'AZA sia limitato all'inibizione delle *DNMT*, esso ha un effetto pleiotropico e aumenta l'espressione di geni la cui espressione potrebbe non essere correlata con la metilazione del promotore delle *CpG islands*. Nel contesto di questo studio molti miRNA indotti dall'AZA non hanno a monte *CpG islands*, e di quelli che ce l'hanno, non tutti esibiscono il corrispondente *pattern* di metilazione atteso. Ci sono diverse spiegazioni dietro questi risultati. Per esempio, l'espressione di fattori di trascrizione o elementi enhancer responsabili della trascrizione dei miRNA potrebbero essere sotto il controllo della metilazione del DNA. Inoltre, l'AZA agisce sulla demetilazione dell'istone H3 della Lisina9 (Nguyen *et al.*, 2002) e così potrebbe amplificare l'espressione dei miRNA la cui espressione è bloccata dalla modificazione degli istoni.

I dati prodotti da tutto il profilo dei miRNA tra controllo e trattato con AZA nelle linee cellulari apre la strada a progetti prossimi riguardanti lo studio dei miRNA e il cancro della prostata. L'uso delle linee cellulari PrEC trattate con l'AZA ha aiutato a discriminare i miRNA silenziati dalla metilazione nel PCa da quelli con metilazione organo-specifica. Comunque i risultati possono anche rivelare candidati microRNA oncogenici (oncomiR), la cui ipo-metilazione avviene in modo cancro-specifico. Per esempio, miR-23b si rivela come un miRNA upregolato dall'AZA solo nelle cellule PrEC e la cui espressione è aumentata nelle linee cellulari tumorali. Inoltre, miR-23b ha a monte una *CpG island*. L'epigenoma delle linee cellulari tumorali differisce da quelle normali nella sua ipermetilazione del promotore di geni soppressori tumorali, ma diversi gruppi hanno anche la presenza documentata di ipometilazione derivante dal rilascio degli oncogeni (Wolff *et al.*, 2010; Brueckner *et al.*, 2007; Gaudet *et al.*, 2003).

LA METILAZIONE CANCRO-SPECIFICA DEI miRNA NELLE LINEE CELLULARI DI PCa

L'MSP nelle linee cellulari di PCa dei miRNA rivela una diminuzione dell'espressione dei miRNA rispetto alle linee cellulari normali PrEC e l'espressione indotta dall'AZA indica che i miRNA sono stati silenziati dalla metilazione. A questo punto i miRNA seguenti sono stati identificati come candidati: miR-132, miR-148a, miR-18b, miR-34b/c e miRNA riuniti in *cluster* miR-542-3p e 450a.

Una *review* del legame tra questi miRNA ed il cancro ha rafforzato la validità del nostro approccio tecnico (Chin *et al.*, 2011) (Fig.25). Infatti la metilazione tumore-specifica del promotore di miR-148a, miR-18b, e miR-34b/c in tumori diversi dalla prostata è stata già descritta (Lujambio *et al.*, 2008; Pavicic *et al.*, 2011; Kalimutho *et al.*, 2011). Un *report* ha trattato di miR-542-3p e della sua capacità di aumentare la proliferazione ed evocare l'apoptosi nelle cellule tumorali (Yoon *et al.*, 2010). La diversa espressione di miR-132 tra i tessuti normali e quelli tumorali indica un ruolo contesto-dipendente come anche un oncomiR o soppressore tumorale per questi miRNA la cui espressione è aumentata nel tumore del pancreas, (Park *et al.*, 2011), del polmone (Yanaihara *et al.*, 2006), della mammella (Anand *et al.*, 2010), del colonretto (Schetter *et al.*, 2008) e della lingua (Wong *et al.*, 2008), e l'espressione è diminuita nell'osteosarcoma (Gougelet *et al.*, 2011) e nei gliomi (Lages *et al.*, 2011). Kozaki *et al.* (2008) trovò che miR-132 era frequentemente silenziato dalla metilazione nelle linee cellulari tumorali del cavo orale rispetto ai cheratinociti (del cavo orale). Un recente *report* ha correlato la metilazione di miR-132 alla carcinogenesi del pancreas (Zhang *et al.*, 2011).

L'utilizzo dell'MSP nelle modalità di *screening* offre un'insieme di vantaggi nella velocità e nell'efficacia ma ha i propri limiti nella ricerca di una piccola regione di una *CpG island*. Le conseguenze di questo svantaggio nelle applicazioni di questo studio si estende inoltre ai miRNA con una grande *CpG island* rispetto a quelli con *CpG island* di lunghezza <1000bp. Diverse coppie di primer di MSP sono spesso disegnate per appaiarsi in differenti regioni di una *CpG island* ed hanno prodotto simili risultati in molti casi (dati non mostrati). Comunque, certamente i miRNA catalogati nella Tab.4.3, come anche miR-132, hanno *CpG island* con una lunghezza di diverse chilobasi. Perciò, ricerche future in questi miRNA potrebbero considerare la possibilità di metilazione esistente in regioni che in questo caso non sono state prese in esame, dal momento che

la metilazione di anche solo poche basi potrebbe portare al controllo della trascrizione (Mossman *et al.*, 2010).

CORRELAZIONE DELLA METILAZIONE DEI miRNA NELLE LINEE CELLULARI DI PCa CON I CASI DI PAZIENTI AFFETTI DA PCa

L'MSP ha offerto una considerevole transizione dall'analisi nelle linee cellulari ai campioni di tessuti FFPE di PCa: la procedura implica lo stesso protocollo e i primers per miR-132, miR-148a, miR-18b, miR-34b/c e miR-542-3p/450a. Gli esperimenti iniziali in questi campioni hanno prodotto un'amplificazione dei bersagli con un'ottima resa per entrambi gli alleli metilati e non metilati e perciò il protocollo ottimizzato nelle linee cellulari è stato mantenuto. Così un risultato positivo è stato ottenuto nonostante l'incertezza nell'analizzare il DNA derivante da tessuti FFPE (Gnanapragasam, 2010; Thirlwell *et al.*, 2010), ciò nonostante la degradazione dei campioni non si è verificata in quanto il tempo di conservazione dei campioni è correlato con la loro degradazione. Infatti i nostri campioni provengono da una prostatectomia radicale eseguita non più di sei anni prima dell'analisi (con più interventi chirurgici eseguiti solo due o tre anni prima). Comunque, l'utilizzo di un approccio come la *nested MSP* o la *laser-capture microdissection (LCM)* (l'MSP aumenta la sensibilità della PCR di più di cento volte mentre l'LCM isola il tessuto tumorale puro) potrebbe aver prodotto differenti risultati per i miRNA dove è stata trovata una debole od alcuna metilazione, che riguarda miR-148a, miR-18b e miR-542-3p/miR-450a. La presenza di bassi livelli di metilazione, di pochi casi tessuti tumorali, o semplicemente la completa assenza di eventi epigenetici aberranti nella popolazione implica che questo fenomeno può essere dovuto alla mancanza di metilazione trovata per questi miRNA nei tumori solidi.

Dati i diversi casi ben documentati della metilazione di miR-34b/c in altri tumori (Tsai *et al.*, 2011; Vogt *et al.*, 2011; Botezatu *et al.*, 2011) come pure nelle linee cellulari di PCa qui implicati, ci si aspetterebbe di vedere risultati simili nei tumori umani. Piuttosto, la presente metilazione è stata riscontrata con poca specificità per il tumore prostatico. La discrepanza nella frequenza di metilazione tra i due tipi di gruppi di controllo- tessuto circostante e tessuto prostatico normale da pazienti con tumore della vescica- è rimasta come la caratteristica più sorprendente di questo risultato. La metilazione di miR-34b/c non ha capacità di distinguere tra tessuti connessi normale/tumorale. Comunque, i campioni normali provenienti da cistoprostatectomie hanno una bassa frequenza di metilazione ed in questi casi di metilazione positiva, è stata osservata una banda debole (dati non mostrati). Questo suggerisce che la metilazione delle *CpG island* non avviene in

modo tumore-specifico ma potrebbe essere correlato con alterazioni del tessuto prostatico spesso presenti con il cancro, come il PIN e l'infiammazione. D'altronde, l'MSP di miR-34b/C potrebbe aver risposto a piccoli foci cancerosi non rilevabili mediante tecniche di colorazione dei tessuti utilizzate, e potrebbe rappresentare anche un metodo più sensibile rispetto a quelli attualmente in uso.

La metilazione delle *CpG island* di miR-132 si è presentata in modo chiaramente discrepante tra i campioni di prostata normali e quelli di PCa, senza riguardo ai sottogruppi di controllo. Questi dati ci portano ad analizzare il livello di espressione di miR-132 in rapporto a diverse variabili cliniche.

RILEVANZA CLINICA DELL'ESPRESSIONE E DELLA METILAZIONE DI miR-132

Per determinare la rilevanza clinica di miR-132 con l'espressione e la metilazione è stata raccolta un'ampia casistica di pazienti con PCa che comprende 50 campioni FFPE. Il dipartimento di patologia del Policlinico Tor Vergata ha in archivio tessuti FFPE, ed inoltre ha consentito la loro immediata accessibilità dopo richiesta. Nonostante un recupero veloce dei campioni, la natura dei tessuti FFPE, come pure l'insieme di campioni raccolti limita la gamma di analisi che si potrebbe realizzare. Il tempo non ha permesso la raccolta di campioni appena congelati, che avrebbero potuto offrire il vantaggio di poca o alcuna degradazione dell'RNA e del DNA, molto importante nell'analisi dell'mRNA. L'inaccessibilità agli strumenti *LCM* che ha impedito qualsiasi analisi affidabile di espressione in rapporto a variabili cliniche, è dovuta alla variabilità nel contenuto del tessuto normale. Inoltre, molti campioni sono originati da prostatectomia eseguita di recente (uno o due anni prima), rendendo così la correlazione con il risultato clinico difficile. Allo stesso modo, la presenza di soli due casi metastatici nella nostra casistica ha reso futile ogni proposito di correlare la metilazione e/o espressione con la metastasi.

Quindi, siamo tornati al *dataset* di Taylor del *GEO website*, comprendente 111 campioni di PCa che includono 13 metastatici. Usando questo *dataset*, l'espressione di miR-132 potrebbe essere correlata con diversi parametri che racchiudono l'incidenza di campioni metastatici, eventi metastatici, invasione nei linfonodi, *Gleason score* patologico, stadiazione tumorale patologica e il tempo di recidiva biochimica. In realtà la correlazione tra i bassi livelli di miR-132 e le prime cinque variabili in aggiunta alla correlazione negativa con il tempo di recidiva biochimica descrive una costante figura dell'invasività del PCa e la potenziale ricorrenza associata ai bassi livelli di miR-132.

Nella nostra casistica di 50 campioni FFPE, abbiamo due parti dei dati patologici- Gleason totale e stadiazione- ricordato per ogni caso. Al posto dei risultati derivanti dal *dataset* di Taylor, è stato postulato che i tumori di elevata stadiazione e/o il *Gleason* totale potrebbero avere un'elevata frequenza della metilazione di miR-132 e nell'analizzare queste premesse è stata trovata una significativa correlazione a supporto della nostra ipotesi. Inoltre, abbiamo eseguito l'analisi di espressione di miR-132 ed è stata trovata una sua diminuita espressione rispetto al controllo solamente nei campioni positivi per la metilazione. Questo risultato dimostra come la metilazione sia la causa nel bloccare l'espressione genica ma avviene, comunque, abbastanza inaspettamente dal momento che la contaminazione da parte delle cellule normali come pure del tessuto stromale ha suggerito l'ipotesi che l'evento potrebbe non essere possibile. Quindi, le successive ricerche hanno incoraggiato ad effettuare simili esperimenti nei campioni *LCM*. In una prima ipotesi è stato ritenuto indispensabile per un'analisi ottimale dell'RT-qPCR controllare attentamente i *geni housekeeping* per garantire l'accuratezza e la riproducibilità dei nostri risultati, molto delicati ed importanti nel caso di campioni FFPE con una grande capacità di degradazione, anche se precedenti studi hanno mostrato che i miRNA sono minimamente influenzati da questa procedura di preservazione dei dati (Liu and Xu, 2011). L'analisi con *geNorm* include altri candidati comunemente usati in letteratura e richiama un interesse importante per tutti gli esperimenti di RT-qPCR: gli snoRNA U18 e U6B sono risultati come *geni housekeeping* molto instabili ed hanno prodotto un risultato biologico diverso quando usati nel processamento dei dati. Il risultato più sorprendente è avvenuto con l'aggiunta di U18 come *gene housekeeping*, poiché porta ad un'ampia diminuzione dell'espressione di miR-132 nei casi tumorali. Tuttavia, successivamente è stato notato che questo proviene da un'aumentata espressione di U18 di forte significatività statistica nei casi di PCa. Questo implica un'impressione artificiale della diminuita espressione nei casi tumorali per ogni gene normalizzato a questo *ncRNA* (dati non mostrati). Naturalmente, questo dato potrebbe avere un largo interesse del ruolo degli *snoRNA* nel cancro, che sono stati il soggetto di molti recenti *report* (Liao *et al.*, 2010; Martens-Uzunova *et al.*, 2011; Gee *et al.*, 2011).

Una limitazione di tale approccio merita di essere menzionata; essa riguarda la perdita di correlazione tra la metilazione, l'espressione e i dati clinici. Un'analisi ideale potrebbe consistere nel trovare una diminuzione dell'espressione di miR-132 associata alla metilazione nell'analisi dei campioni *LCM* di PCa ed aventi questa espressione e i dati della metilazione correlati a variabili cliniche in questi stessi casi. In questo lavoro comunque questa possibilità non si è verificata a causa del contesto dei nostri campioni e della casistica dei pazienti.

IL RUOLO BIOLOGICO DELLA FUNZIONE DI miR-132 NELLE CELLULE PC3

L'analisi delle cellule PC3 trasfettate con miR-132 in relazione a quelle trasfettate con la sequenza *scrambled* di controllo punta verso l'inizio dell'*anoikis*- un tipo di morte cellulare che dipende dalla mancata adesione cellulare- a 96h per le seguenti ragioni: (i) a 72h, un gran numero di cellule esprimenti miR-132 galleggiano nel mezzo, ma sono vive come evidenziato dai risultati con *trypan blue*, LDH e citometria a flusso; (ii) non ci sono influenze sul ciclo cellulare a 48h e a 72h dopo la trasfezione; (iii) approssimativamente metà delle cellule galleggianti sono morte entro 24h di sospensione, come confermato dai dati della morte cellulare indotta dalla ri-espressione di miR 132 a 72h e a 96h dopo trasfezione. Altri *report* hanno osservato l'adesione come un fattore indispensabile nelle metastasi ossee nel tumore della prostata (PCa), per cui le linee cellulari PC3 rimangono un modello (Cooper and Pienta, 2000; Chu *et al.*, 2008). In verità, certamente gli agenti terapeutici usati in anticipo al trattamento del PCa inducono l'*anoikis* e un innesco, un fenotipo nelle cellule PCa simile a quello causato da miR-132 (Boissier *et al.*, 1997; Matsunaga *et al.*, 2007).

La correlazione dell'espressione di miR-132 e la metilazione del promotore con i dati clinico-patologici in questo studio suggerisce che questo miRNA contribuisce profondamente all'aggressività del PCa. La funzione di miR-132 nelle cellule PC3 lega bene con questa relazione.

Il distacco cellulare seguito dalla morte si presenta come un fenotipo suggestivo osservato dopo la trasfezione di miR-132, ed è correlato con l'adesione come pure con il superamento della resistenza all'*anoikis*- due aspetti importanti per ottenere la metastasi. *HB-EGF* e *TALIN2* sono coinvolti nell'adesione cellulare e sono reputati *target* di questi miRNA. L'adesione e la resistenza all'*anoikis* sono due fenotipi caratteristici dei passaggi finali della tumorigenesi dopo che le linee cellulari tumorali si sono staccate dal loro sito di origine. Quindi, si sospetta che l'espressione dei *target* abbia un rapporto inverso rispetto ai livelli di miR-132 nei tumori metastatici. Il *Taylor dataset* offre la possibilità di testare questa ipotesi, ed anche se il risultato non è statisticamente significativo (probabilmente dati i pochi casi metastatici disponibili), il rapporto inverso rappresenta comunque una prova.

L'*anoikis* evocata da miR-132 accoppiata con la conferma di adesione dei *target* stabilisce le basi di diversi progetti futuri nel contesto di miR-132 e del tumore della prostata. Specialmente dati i recenti *report* di successo sui *miRNA delivery* nei topi (Wu *et al.*, 2011; Huynh *et al.*, 2011), persiste la tentazione di testare non solo l'effetto di miR-132 nel PCa *in vivo* ma anche il risultato

dell'RNAi mirato ad *HB-EGF* e *Talin2*. E' noto molto poco circa *Talin2*. In particolare, data la sua importanza nell'attacco delle cellule PC3, altamente aderenti, la sua mancata espressione in questa linea cellulare (Sakamoto *et al.*, 2010), e la tendenza del tumore prostatico a metastasi ossee; l'adesione come una necessità nella sua riuscita risiede nelle seguenti domande: *Talin2* ha un ruolo nelle metastasi ossee? Il suo ruolo sostituisce quello di *Talin1* nelle cellule PC3 e nell'osso? Questo contribuisce alla resistenza all'*anoikis*? Queste ed altre domande ancora saranno oggetto di studi futuri per capire i complessi meccanismi che risiedono nello sviluppo tumorale, nella sua fase di dormienza che porta a recidiva o a metastatizzazione ed infine nel processo di farmacoresistenza di alcune molecole.

§ V. CONCLUSIONE

In conclusione, il lavoro ha descritto il silenziamento di miR-132 causato dalla metilazione a livello delle *CpG island* nel tumore della prostata in un modo positivamente correlato con la stadiazione patologica del tumore e con il *Gleason score*. Inoltre, una diminuita espressione di miR-132 sembra essere correlata con una peggiore prognosi a livello clinico. I risultati qui presentati garantiscono studi futuri su una popolazione più ampia poiché potrebbero portare dei miglioramenti nella diagnosi e nel trattamento del PCa. Prima di tutto, la metilazione di miR-132 a livello della *CpG island* potrebbe essere utilizzata per completare il quadro del *Gleason score* da parte del patologo ed eliminare errori da parte dell'operatore. In secondo luogo, l'espressione di miR-132 in tumori solidi della prostata potrebbe fornire evidenze aggiuntive come la progressione del cancro, la prognosi e un appropriato trattamento. Infine, dal momento che i progressi nei sistemi di *RNA delivery* evolvono e -si spera- raggiungano un livello appropriato per il suo impiego nell'uomo, la ri-espressione di miR-132 potrebbe trovare l'utilizzo nelle terapie anti-metastatiche per il tumore prostatico avanzato. I risultati di questo studio, comunque, sollevano anche preoccupazioni circa la manipolazione dei miRNA ed il suo futuro nelle terapie: la scoperta di una funzione anti-tumorale di miR-132 nella tumorigenesi del tumore prostatico malgrado il suo ruolo documentato come un oncomiR in altri tumori rafforza il concetto di una funzione poliedrica dei microRNA e quindi sottolinea la necessità di integrare con cautela i miRNA in un'altra nuova strategia terapeutica.

Studi successivi a questo progetto potrebbero imporre un punto di vista biochimico in rapporto alle cellule della prostata e alla trascrizione di miR-132. Quali fattori di trascrizione intervengono su miR-132 in questo tipo di cellule e dove si legano? Infatti, miR-132 si trova incorporato all'interno di una grande *CpG island*, dove i programmi bioinformatici predicono il legame di numerosi e diversi fattori di trascrizione (dati non mostrati).

I risultati prodotti mostrano che nel cancro della prostata miR-132 diminuisce l'adesione cellulare aumentando la morte cellulare, contrastando col tipico comportamento delle cellule tumorali a rimanere adese ad un organo estraneo. Un ruolo simile può spiegare la correlazione trovata qui tra la diminuzione dei livelli di miR132, l'aumento della capacità a formare metastasi e la preoccupazione per le strategie terapeutiche attuali: i farmaci chemioterapici, usati per reprimere l'invasività tumorale dovuta ad un'aumentata aderenza cellulare, potrebbero dare alle cellule circolanti un vantaggio nella loro capacità di formare metastasi? Studi successivi saranno volti a comprendere questi fenomeni.

§ VI. BIBLIOGRAFIA

- Adam, RM., Kim, J., Lin, J., Orsola, A., Zhuang, L., Rice, DC., and Freeman, MR. (2002). Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor stimulates androgen-independent prostate tumor growth and antagonizes androgen receptor function. *Endocrinology* 143(12), 4599-608.
- Akiyama, Y., Watkins, N., Suzuki, H., Jair, KW., van Engeland, M., Sakai, H., Ren, CY., Yuasa, Y., Herman, JG., and Baylin, SB. (2003). GATA-4 and GATA-5 transcription factor genes and potential downstream antitumor target genes are epigenetically silenced in colorectal and gastric cancer. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8429-8439.
- Aaltomaa, S., Lipponen, P., Eskelinen, M., Ala-Opas, M., and Kosma, VM. (1999). Prognostic value and expression of p21 (waf1/cip1) protein in prostate cancer. *Prostate*. 39(1), 8-15.
- Albain, KS., Unger, JM., Crowley, JJ., Coltman, CA., and Hershman, DL. (2009). Racial disparities in cancer survival among randomized clinical trials patients of the Southwest Oncology Group. *J. Natl. Cancer Inst.* 101(14), 984-92.
- Alkarain, A., Jordan, R., and Slingerland, J. (2004). p27 deregulation in breast cancer: prognostic significance and implications for therapy. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 9(1), 67-80.
- Ambros, V., Lee, RC., Lavanway, A., Williams, PT., and Jewell, D. (2003). MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr Biol.* 13(10):807-18.
- Anand, S., Majeti, BK., Acevedo, LM., Murphy, EA., Mukthavaram, R., Schepke, L., Huang, M., Shields, DJ., Lindquist, JN., Lapinski, PE., King, PD., Weis, SM., and Cheresch, DA. (2010). MicroRNA-132-mediated loss of p120RasGAP activates the endothelium to facilitate pathological angiogenesis. *Nat. Med.* 16(8), 909-14.
- Antequera, F., and Bird, A. (1993). CpG islands. *EXS*. 64, 169-85.
- Bartel, DP. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell*. 116, 281-97.
- Bartkowiak, D., Högnér, S., Baust, H., Nothdurft, W., and Röttinger, EM. (1999). Comparative analysis of apoptosis in HL60 detected by annexin-V and fluorescein-diacetate. *Cytometry*. Nov.1; 37(3), 191-6.
- Basame, S., Wai-lun Li, P., Howard, G., Branciforte, D., Keller, D., and Martin, SL. (2006). Spatial assembly and RNA binding stoichiometry of LINE-1 protein essential for retrotransposition. *J. Mol. Biol.* 24;35782, 351-7.
- Baylin, SB. (2005). DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2 Suppl. 1, S4-11.

- Bentwich, I., Avniel, A., Karov, Y., Aharonov, R., Gilad, S., Barad, O., Barzilai, A., Einat, P., Einav, U., Meiri, E., Sharon, E., Spector, Y., and Bentwich, Z. (2005). Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat. Genet.* *37*(7), 766-70.
- Berezikov, E., Guryev, V., van de Belt, JW., Wlenholds, E., Plasterk, RH., and Cuppen, E. (2005). Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. *Cell.* *120*, 21-24.
- Berges, RR., Vukanovic, J., Epstein, JI., CarMichel, M., Cisek, L., Johnson, DE., Veltri, RW., Walsh, PC., and Isaacs, JT. (1995). Implication of cell kinetic changes during the progression of human prostatic cancer. *Clin Cancer Res.* *1*(5), 473-80.
- Bernardini, S., Milano, R., Finazzi-Agrò, E., Palmieri, G., Ballerini, S., Angeloni, C., Orlandi, A., Bellincampi, L., Cortese, C. and Federici, G. (2004). Hypermethylation of the CpG islands in the promoter region of the GSTP1 gene in prostate cancer: a useful diagnostic and prognostic marker? *Clin. Chim. Acta.* *350*(1-2), 181-8.
- Bernstein, BE., Caudy, AA., Hammond, SM., and Hannon, JL. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* *409*, 363-366.
- Bernstein, BE., Meissner A., and Lander, ES. (2007). The mammalian epigenome. *Cell.* *128*, 669-681.
- Bestor, TH. (1990). DNA methylation: evolution of a bacterial immune function into a regulator of gene expression and genome structure in higher eukaryotes. *Philos Trans R. Soc Lond B. Biol. Sci.* *326*(1235), 179-87.
- Bestor, TH. (1998). The host defence function of genomic methylation patterns. *Novartis Found Symp.* *214*, 187-95, discussion 195-9, 228-32.
- Beuten, J., Gelfond, JA., Franke, JL., Shook, S., Johnson-Pais, TL., Thompson, IM., and Leach, RJ. (2010). Single and multivariate associations of MSR1, ELAC2, and RNASEL with prostate cancer in an ethnic diverse cohort of men. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* *19*(2), 588-99.
- Bird, AP., and Wolffe, AP. (1999). Methylation-induced repression-belts, braces and chromatin. *Cell.* *99*(5), 451-4.
- Bird, A. (2002). DNA Methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* *16*, 6-21.
- Bohem, M., Yoshimoto, Y., Crook, MF., Nallamshetty, S., True, A., Nabel, GJ., and Nabel, EG. (2002). A growth factor-dependent nuclear kinase phosphorylates p27 (Kip1) and regulates cell cycle progression. *EMBO J.* *21*, 3390-3401.
- Boissier, S., Magnetto, S., Frappart, L., Cuzin, B., Ebetino, FH., Delmas, PD., and Clezardin, P. (1997). Bisphosphonates inhibit prostate and breast carcinoma cell adhesion to unmineralized and mineralized bone extracellular matrices. *Cancer Res.* *57*(18), 3890-4.

- Bookstein, R., MacGrogan, D., Hilsenbeck, SG., Sharkey, F., and Allred, DC. (1993). P53 is mutated in a subset of advanced-stage prostate cancers. *Cancer Res.* 53, 3369-73.
- Botezatu, A., Goia-Rusanu, CD., Iancu, IV., Huica, I., Plesa, A., Socolov, D., Ungureanu, C., and Anton, G. (2011). Quantitative analysis of the relationship between micro-RNA-124a, -34b and -203 gene methylation and cervical oncogenesis. *Mol.Med.Report.* 4(1), 121-8.
- Brandes, JC., Carraway, H., and Herman, JG. (2007). Optimal primer design using the novel primer design program: MSPprimer provides accurate methylation analysis of the ATM promoter. *Oncogene* 26, 6229-6237. doi:10.1038/sj.onc.1210433.
- Breslow, N., Chan, CW., Dhom, G., Drury, RA., Franks, LM., Gellei, B., Lee, YS., Lundberg, S., Sparke, B., Sternby, NH., and Tulinius, H. (1977). Latent carcinoma of prostate at autopsy in seven areas. The International Agency for Research on Cancer, Lyons, France. *Int. J. Cancer.* 20(5), 680-8.
- Brueckner, B., Stresemann, C., Kuner, R., Mund, C., Musch, T., Meister, M., Sülthmann, H., and Lyko, F. (2007). The human let-7a-3 locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function. *Cancer Res.* 15;67(4), 1419-23.
- Bussemakers, MJ., van Bokhoven, A., Verhaegh, GW., Smith, F., Karthaus, HFM., Schalken, JA., Debruyne, FMJ., Ru, N., and Isaacs, WB. (1999). DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res.* 59(23), 5975-9.
- Calin, GA., Dumitru, CD., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., and Croce, CM. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q 14 in chronic lymphocytic leukaemia. *PNAS.* 99, 15524-29.
- Calin, GA., Sevignani, C., Dumitru, CD., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., and Croce, CM. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *PNAS.* 101, 2999-3004.
- Calin, GA., Ferracin, M., Cimmino, A., Di Leva, G., Shimizu, M., Wojcik, SE., Iorio, MV., Visone, R., Sever, NI., Fabbri, M., Iuliano, R., Palombo, T., Pichiorri, F., Roldo, C., Garzon, R., Sevignani, C., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, CG., Kipps, TJ., Negrini, M., and Croce, CM. (2005). A microRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukaemia. *N. Engl. J. Med.* 353, 1793-1801.
- Calin, GA., and Croce, CM. (2006). MicroRNA signatures in human cancer. *Nature Rev.* 6, 857-66.
- Carmell, MA., and Hannon, GJ. (2004). RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nature Struct. Mol. Biol.* 11, 214-18.
- Casaccia-Bonnet, P., Tikoo, R., Kiyokawa, H., Friedrich, Jr. V., Chao MV., and Koff, A. (1997). Oligodendrocyte precursor differentiation is perturbed in the absence of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 kip1. *Genes Dev.* 11, 2335-46.

Catto, JW., Alcaraz, A., Bjartell, AS., De Vere White, R., Evans CP., Fussel, S., Hamdy, FC., Kallioniemi, O., Mengual, L., Schlomm, T., and Visakorpi, T. (2011). MicroRNA in prostate, bladder, and kidney cancer: a systematic review. *Eur Urol.* 59(5):671-81.

Chan, JA., Krichevsky, AM., and Kosik, KS. (2005). MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 65(14), 6029-33.

Chen, Y., Martinez, LA., LaCava, M., Coghlan, L., and Conti, CJ. (1998). Increased cell growth and tumorigenicity in human prostate LNCaP cells by overexpression of Cyclin D1. *Oncogene.* 16, 1913-20.

Chen, H., Nandi, AK., Li, X., and Bieberich, CJ. (2002). NKX-3.1 interacts with prostate-derived Ets factor and regulates the activity of the PSA promoter. *Cancer Res.* 62, 338-40.

Chiang, PK., Gordon, PK., Tal, J., Zeng, GC., Doctor, BP., Pardhasaradhi, K., and McCann, PP. (1996). S-adenosylmethionine and methylation. *FASEB J.* 10, 471-480.

Chin, SP., Dickinson, JL., and Holloway, AF. (2011). Epigenetic regulation of prostate cancer. *Clin Epigenetics.* 2(2), 151-69.

Chu, K., Cheng, CJ., Ye, X., Lee, YC., Zurita, AJ., Chen, DT., Yu-Lee, LY., Zhang, S., Yeh, ET., Hu, MC., Logothetis, CJ., and Lin, SH. (2008). Cadherin-11 promotes the metastasis of prostate cancer cells to bone. *Mol.Cancer.Res.* 6(8), 1259-67.

Ciafrè, SA., Galardi, S., Mangiola, A., Ferracin, M., Liu, CG., Sabatino, G., Negrini, M., Maira, G., Croce, CM., and Farace, MG. (2005). Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 334(4), 1351-8.

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, CM. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *PNAS.* 102, 13944-49.

Clurman, BE., and Hayward, WS. (1989). Multiple proto-oncogene activations in avian leucosis virus-induced lymphomas: evidence for stage-specific events. *Mol.Cell.Biol.* 9, 2657-64.

Cookson, MM. (2001). Prostate cancer: screening and early detection. *Cancer Control.* 8(2),133-40.

Cooper, CR. and Pienta, KJ. (2000). Cell adhesion and chemotaxis in prostate cancer metastasis to bone: a minireview. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 3(1), 6-12.

Cybulsky, C., Wokolorczyk, D., Jakubowska, A., Gliniewicz, B., Sikorski, A., Huzarski, T., Debniak, T., Narod, SA., and Lubiński, J. (2007). DNA variation in MSR1, RNASEL and E-cadherin genes and prostate cancer in Poland. *Urol. Int.* 79(1), 44-9.

Del Sal, G., Loda, M., and Pagano, M. (1996). Cell cycle and cancer: critical events at the G1 restriction point. *Crit. Rev. Oncog.* 7, 127-42.

- De la Taille, A. (2007). Progens PCA3 test for prostate cancer detection. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 7 (5), 491-7.
- Denmeade, SR., Lin, XS., and Isaacs, JT. (1996). Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer. *Prostate.* 28(4), 251-65.
- Denmeade, SR., and Isaacs, JT. (1996). Activation of programmed (apoptotic) cell death for the treatment of prostate cancer. *Adv. Pharmacol.* 35, 281-306.
- Di Croce, L., Raker, VA., Corsaro, M., Fazi, F., Fanelli, M., Fuks, F., Lo Coco, F., Kouzarides, T., Nervi, C., Minucci, S., and Pelicci, PG. (2002). Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science.* 295, 1079-1082.
- Dinjens, WN., van der weiden, NM., Schroeder, FH., Bosman, FT., and Trapman, J. (1994). Frequency and characterization of p53 mutations in primary and metastatic human prostate cancer. *Int. J. Cancer.* 56, 630-3.
- Doench, JG., and Sharp, PA. (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* 18, 504-11.
- Drobnjak, M., Osman, I., Scher, HI., Fazzari, M. and Cordon-Cardo, C. (2000). Overexpression of Cyclin D1 is associated with metastatic prostate cancer to bone. *Clinical Cancer Res.* 6(5), 1891-5.
- Eden, A., Gaudet, F., Waghmare, A. and Jaenisch, R. (2003). Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science.* 18;300(5618), 455.
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., and Jones, PA. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature.* 429, 457-463.
- Eis, PS., Tam, W., Sun, L., Chadburn, A., Li, Z., Gomez, MF., Lund, E. and Dahlberg, JE. (2005). Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *PNAS.* 102, 3627-32.
- Esquela-Kerscher, A. and Slack, FJ. (2006). Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nat.Rev.* 6, 259-69.
- Esteve, PO., Chin, HG., Benner, J., Feehery, GR., Samaranayake, M., Horwitz, GA., Jacobsen, SE., and Pradhan, S. (2009). Regulation of DNMT1 stability through SET7-mediated lysine methylation in mammalian cells. *Proc. Natl Acad. Sci.USA* 106, 5076-5081.
- Etzioni, R., Penson, DF., Legler, JM., Di Tommaso, D., Boer, R., Gann, PH., and Feuer, EJ. (2002). Overdiagnosis due to prostate-specific antigen screening: lessons from U.S. prostate cancer incidence trends. *J.Nat.Cancer Inst.* 94(13), 958-60.
- Feinberg, AP., and Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature.* 301, 89-92.

Feinberg, AP., Ohlsson, R. and Henikoff, S. (2006). The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat.Rev.Genet.* 7, 21-33.

Feinberg, AP. (2008). The essential of DNA methylation. *Cell.* 70, 5-8.

Filipowicz, W., Jaskiewicz, L., Kolb, FA., and Pillai, RS. (2005). Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15(3), 331-41.

Freimuth, N., Ramer, R., and Hinz, B. (2009). Antitumorigenic effects of cannabinoids beyond apoptosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 33(2), 336-44.

Frisch, SM., and Francis, H. (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell. Biol.* 124, 619-626.

Frisch, SM. and Ruoslahti, E. (1997). Integrins and *Anoikis*. *Curr.Opin.Cell.Biol.* 9, 701-706.

Frisch SM., and Screaton, RA. (2001). *Anoikis* mechanisms. *Curr.Opin.Cell.Biol.* 13, 555-562.

Fujita, Y., Kojima, K., Hamada, N., Ohhashi, R., Akao, Y., Nozawa, Y., Deguchi, T., and Ito, M. (2008). Effects of miR-34a on cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 377, 114-119.

Galardi, S., Mercatelli, N., Giorda, E., Massalini, S., Frajese, GV., Ciafré, SA. and Farace, MG. (2007). miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27(Kip1)*. *J. Biol. Chem.* 282, 23716-23724.

Galluzzi, L., Aaronson, SA., Abrams, J., Alnemri, ES., Andrews, DW., Baehrecke, EH., Bazan, NG., Blagosklonny, MV., Blomgren, K., Borner, C., Bredesen, DE., Brenner, C., Castedo, M., Cidlowski, JA., Ciechanover, A., Cohen, GM., De Laurenzi, V., De Maria, R., Deshmukh, M., Dynlacht BD El-Deiry, WS., Flavell, RA., Fulda, S., Garrido, C., Golstein, P., Gougeon, ML., Green, DR., Gronemeyer, H., Hajnóczky, G., Hardwick, JM., Hengartner, MO., Ichijo, H., Jäättelä, M., Kepp, O., Kimchi, A., Klionsky, DJ., Knight, RA., Kornbluth, S., Kumar, S., Levine, B., Lipton, SA., Lugli, E., Madeo, F., Malomi, W., Marine, JC., Martin, SJ., Medema, JP., Mehlen, P., Melino, G., Moll, UM., Morselli, E., Nagata, S., Nicholson, DW., Nicotera, P., Nuñez, G., Oren, M., Penninger, J., Pervaiz, S., Peter, ME., Piacentini, M., Prehn, JH., Puthalakath, H., Rabinovich, GA., Rizzuto, R., Rodrigues, CM., Rubinsztein, DC., Rudel, T., Scorrano, L., Simon, HU., Steller, H., Tschoop, J., Tsujimoto, Y., Vandenabeele, P., Vitale, I., Voutsden, KH., Youle, RJ., Yuan J., Zhivotovsky, B., and Kroemer, G. (2009). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ.* 16(8), 1093-107.

Gal-Yam, EN., Saito, Y., Egger, G., and Jones, PA. (2008). Cancer epigenetics: modifications, screening, and therapy. *Annu. Rev. Med.* 59, 267-80.

Ganoth, D., Bornstein, G., Ko, TK., Larsen, B., Tyers, M., Pagano, M., and Hershko, A. (2001). The cell-cycle regulatory protein Cks1 is required for SCF(Skp2)-mediated ubiquitylation of p27. *Nat. Cell. Biol.* 3, 321-24.

- Gao, X., Zacharek, A., Grignon, DJ., Sakr, W., Powell, IJ., Porter, AT., and Honn, KV. (1995). Localization of potential tumor suppressor loci a < 2Mb region on chromosome 17q in human prostate cancer. *Oncogene*. 11(7), 1241-7.
- Garofalo, M., and Croce, CM. (2011). MicroRNAs: Master regulators as potential therapeutics in cancer. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 51, 25-43.
- Gaudet, F., Hodgson, JG., Eden, A., Jackson-Grusby, L., Dausman, J., Gray, JW., Leonhardt, H. and Jaenisch, R. (2003). Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science*. 18;300(5618), 489-92.
- Gee, HE., Buffa, FM., Camps, C., Ramachandran, A., Leek, R., Taylor, M., Patil, M., Sheldon, H., Betts, G., Homer, J., West, C., Ragoussis, and Harris, AL. (2011). The small-nucleolar RNAs commonly used for microRNA normalisation correlate with tumour pathology and prognosis. *Br.J.Cancer*. 29;104(7), 1168-77.
- Gnanapragasam, VJ. (2010). Unlocking the molecular archive: the emerging use of formalin-fixed paraffin-embedded tissue for biomarker research in urological cancer. *BJU Int*. 105(2), 274-8.
- Goll MG., and Bestor, TH. (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 481-514.
- Gore, SD., Jones, C., and Kirkpatrick, P. (2006). Decitabine. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5(11), 891-2.
- Gougelet, A., Pissaloux, D., Besse, A., Perez, J., Duc, A., Dutour, A., Blay, JY., and Alberti, L. (2011). Micro-RNA profiles in osteosarcoma as a predictive tool for ifosfamide response. *Int.J.Cancer*. 129(3), 680-90.
- Greger, V., Passarge, E., Höpping, W., Messmer, E., and Horsthemke, B. (1989). Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum. Genet.* 83, 155-158.
- Gu, K., Mes-Masson, AM., Gauthier, J., and Saad, F. (1998). Analysis of the p16 tumor suppressor gene in early stage prostate cancer. *Molecular carcinogenesis*. 21(3), 164-70.
- Guénin, S., Mauriat, M., Pelloux, J., Van Wuytswinkel, O., Bellini, C., and Gutierrez, L. (2009). Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *J. Exp. Bot.* 60(2), 487-93.
- Ha, I., Wightman, B., and Ruvkun, G. (1996). A bulged lin-4/lin-14 RNA duplex is sufficient for *Caenorhabditis elegans* lin-14 temporal gradient formation. *Genes Dev.* 10, 3041-50.
- Haberland M., Montgomery RL. and Olson EN. (2009). The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat.Rev. Genet.* 10, 32-42.

- Haese, A., De la Taille, A., van Poppel, H., Marberger, M., Stenzl, A., Mulders, PF., Huland, H., Abbou, CC., Remzi, M., Tinzl, M., Feyerabend, S., Stillebroer, AB., van Gils, MP., and Schalken, JA. (2008). Clinical Utility of the PCA3 Urine Assay in European Men Scheduled for Repeat Biopsy. *Eur. Urol.* 54(5), 1081.
- Hake, S. (2003). MicroRNAs: a role in plant development. *Curr. Biol.* 13, 851-52.
- Harfe, BD. (2005). MicroRNAs in vertebrate development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15, 410-15.
- Harris, KS., Zhang, Z., McManus, MT., Harfe, BD., and Sun, X. (2005). Dicer function is essential for lung epithelium morphogenesis. *PNAS.* 103, 2208-13.
- He, L., and Hannon, GJ. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* 5(7), 522-31.
- He, H., Jazdzewski, K., Li, W., Liyanarachchi, S., Nagy, R., Volinia, S., Calin, GA., Liu, CG., Franssila, K., Suster, S., Kloos, RT., Croce, CM., and de la Chapelle, A. (2005). The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *PNAS.* 102(52), 19075-80.
- He, L., Thomson, JM., Hemann, MT., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, SW., Hannon, GJ., and Hammond, SM. (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature.* 435, 828-33.
- Hebbes, TR., Thorne, AW., and Crane-Robinson, C. (1988). A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J.* 7, 1395-1402.
- Herman, JG. (1999). Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer. *Semin. Cancer Biol.* 9, 359-67.
- Herman, JG, Graff, JR, Myöhänen, S, Nelkin, BD, and Baylin, SB. (1996). Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93(18), 9821-6.
- Hessels, D., and Schalken, JA. (2009). The use of PCA3 in the diagnosis of prostate cancer. *Nat. Rev. Urol.* 5(6), 255-61.
- Hill, R., Song, Y., Cardiff, RD., and Van Dyke, T. (2005). Heterogeneous tumor evolution initiated by loss of pRb function in a preclinical prostate cancer model. *Cancer Res.* 65, 10243-54.
- Hoebeeck, J., Michels, E., Pattyn, F., Combaret, V., Vermeulen, J., Yigit, N., Hoyoux, C., Laureys, G., De Paepe, A., Speleman, F., and Vandesompele, J. (2008). Aberrant methylation of candidate tumor suppressor genes in neuroblastoma. *Cancer Lett.* 273(2), 336-46.
- Hoffman, RM., Gilliland, FD., Adams-Cameron, M., Hunt, WC., and Key, CR. (2002). Prostate-specific antigen testing accuracy in community practice. *BMC Fam. Prac.* 3(1), 19.

- Horoszewicz, JS., Leong, SS., Kawinski, E., Karr, JP., Rosenthal, H., Chu, TM., Mirand, EA., and Murphy, GP. (1983). LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res.* 43, 1809-1818.
- Huynh, C., Segura, MF., Gaziel-Sovran, A., Menendez, S., Darvishian, F., Chiriboga, L., Levin, B., Meruelo, D., Osman, I., Zavadil, J., Marcusson, EG., and Hernando, E. (2011). Efficient in vivo microRNA targeting of liver metastasis. *Oncogene.* 30(12), 1481-8.
- Iorio, MV., Ferracin, M., Liu, CG., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., Magri, E., Pedriali, M., Fabbri, M., Campiglio, M., Mènard, S., Palazzo, JP., Rosenberg, A., Musini, P., Volinia, S., Nenci, I., Calin, GA., Querzoli, P., Negrini, M., and Croce, CM. (2005). MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* 65(16), 7065-70.
- Isaacs, JT., and Copffey, DS. (1989). Etiology and disease process of benign prostatic hyperplasia. *Prostate Suppl.* 2, 33-50.
- Isaacs, JT. (1999). The biology of hormone refractory prostate cancer. Why does it develop? *Urol. Clin. North Am.* 26(2), 263-73.
- Issa, JP. (2003). Decitabine. *Curr. Opin. Oncol.* 15(6), 446-51.
- Issa, JP. (2005). Optimizing therapy with methylation inhibitors in myelodysplastic syndromes: dose, duration, and patient selection. *Nat. Clin. Pract. Oncol. Suppl* 1, S24-9.
- Jarrad, DF., Bova, GS., Ewing, CM., Pin, SS., Nguyen, SH., and Baylin, SB. (1997). Deletional, mutational, and methylation analysis of CDKN2 in primary and metastatic prostate cancer. *Genes Chromosomes & Cancer.* 19(2), 90-6.
- Jenuwein, T., and Allis, CD. (2001). Translating the histone code. *Science.* 293, 1074-1080.
- Jiang, C. and Pugh, BF. (2009). Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. *Nat. Rev. Genet.* 10, 161-172.
- Jimenez, JA., Kao, C., Raikwar, S., Evangelisti, C., and Gardner, TA. (2006). Current status of antiangiogenesis therapy for prostate cancer. *Urol. Oncology.* 24(3), 260-8.
- Jones, PL., Veenstra, GJ., Wade, PA., Vermaak, D., Kass, SU., Landsberger, N., Strouboulis, J., and Wolffe, AP. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat. Genet.* 19, 187-191.
- Jones, PA., and Laird, PW. (1999). Cancer epigenetics comes of age. *Nat. Genet.* 21, 163-7.
- Jones, PA., and Baylin, SB. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 7, 21-23.
- Jones, PA., and Baylin, SB. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell.* 128, 683-692.

Jose, D., Debes, MD., and Donald, J. Tindall. (2004). Mechanisms of androgen-refractory prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* 351, 1488-1490.

Kaighn, ME., Narayan, KS., Ohnuki, Y., Lechner, JF., and Jones, LW. (1979). Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest. Urol.* 17, 16-23.

Kalimutho, M., Di Cecilia, S., Del Vecchio Blanco, G., Roviello, F., Sileri, P., Cretella, M., Formosa, A., Corso, G., Marrelli, D., Pallone, F., Federici, G., and Bernardini, S. (2011). Epigenetically silenced miR-34b/c as a novel faecal-based screening marker for colorectal cancer. *Br.J.* 104(11), 1770-8.

Karube, Y., Tanaka, H., Osada, H., Tomida, S., Tatematsu, Y., Yanagisawa, K., Yatabe, Y., Takamizawa, J., Miyoshi, S., Mitsudomi, T., and Takahashi, T. (2005). Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci.* 96, 111-15.

Kawamata, N., Morosetti, R., Miller, CW., Park, D., Spirin, KS, Nakamaki, T., Takeuchi, S., Hatta, Y., Simpson, J., and Wilczynski, S. (1995). Molecular analysis of the cyclin-dependent kinase gene p27Kip1 in human malignancies. *Cancer Res.* 55(11), 2266-9.

Kent, OA., and Mendell, JT. (2006). A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressor and oncogenes. *Oncogene.* 25, 6188-96.

Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, SD. (2003). Functional siRNA and miRNAs exhibit strand bias. *Cell.* 115, 209-16.

Kim, GD., Ni, J., Kelesoglu, N., Roberts, RJ., and Pradhan, S. (2002). Co-operation and communication between the human maintenance and *de novo* DNA (cytosine-5) methyltransferases. *EMBO J.* 21, 4183-4195.

Kim, VN. (2005). Small RNAs: classification, biogenesis, and function. *Mol. Cells.* 19(1), 1-15.

Kiyokawa, H., Kineman, RD., ManovaTodorova, KO., Soares, VC., Hoffman, ES., Ono, M., Khanam, D., Hayday, AC., Frohman, LA., and Koff, A. (1996). Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27Kip1. *Cell.* 85, 721-32.

Kluiver, J., Poppema, S., de Jong, D., Blokzijl, T., Harms, G., Jacobs, S., Kroesen, BJ., and van den Berg, A. (2005). BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J. Pathol.* 207, 243-49.

Konishi, N., Shimada, K., Ishida, E., and Nakamura, M. (2005). Molecular pathology of prostate cancer. *Pathology International.* 55, 531-39.

Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their functions. *Cell.* 128, 693-705.

Kouzarides, T., and Berger, SL. (2007). Chromatin modifications and their mechanism of action. In: Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D (eds) *Epigenetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor pp 191-209.

- Kozaki, K., Imoto, I., Mogi, S., Omura, K., and Inazawa, J. (2008). Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer Res.* 68(7), 2094-105.
- Kristensen, LS., and Hansen, LL (2009). PCR-Based Methods for Detecting Single-Locus DNA-Methylation Biomarkers in Cancer Diagnostic, Prognostic, and Response to Treatment. *Clin Chem.* 55, 1471-83.
- Lages, E., Guttin, A., El Atifi, M., Ramus, C., Ipas, H., Dupré, I., Rolland, D., Salon, C., Godfraind, C., deFraipont, F., Dhobb, M., Pelletier, L., Wion, D., Gay, E., Berger, F., Issartel, JP. (2011). MicroRNA and target protein patterns reveal physiopathological features of glioma subtypes. *PLoS One.* 6(5), e20600.
- Lagos-Quintana., Rauhunt, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr. Biol.* 12, 735-39.
- Lattouf, JB., Srinivasan, R., Pinto, PA., Linehan, WM., and Neckers, L. (2006a). Mechanisms of disease: the role of heat-shock protein 90 in genitourinary malignancy. *Nat. Clin. Pract. Urol.* 3(11), 590-601.
- Lattouf, JB., Arlen, PM., Pinto, PA., and Gulley, JL. (2006b). A phase I feasibility study of an intraprostatic prostate-specific antigen-based vaccine in patients with prostate cancer with local failure after radiation therapy or clinical progression on androgen-deprivation therapy in the absence of local definitive therapy. *Clin. Genitourin Cancer.* 5(1), 89-92.
- Laxman, B., Morris, DS., Yu, J., Siddiqui, J., Cao, J., Mehra, R., Lonigro, RJ., Tsodikov, A., Wei, JT., Tomlins, SA., and Chinnaiyan, AM. (2008). A first-generation multiplex biomarker analysis of urine for the early detection of prostate cancer. *Cancer Res.* 68(3), 645-9.
- Lee, RC., Feinbaum, RL., and Ambros, V. (1993). The *C.elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 75, 843-54.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., and Kim, VN. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature.* 425, 415-19.
- Lee, YS., Kim, HK., Chung, S., Kim, KS., and Dutta, A. (2005). Depletion of human micro-RNA miR-125b reveals that it is critical for the proliferation of differentiated cells but not for the downregulation of putative targets during differentiation. *J. Biol. Chem.* 280, 16635-16641.
- Lefever, S., Hoebeeck, J., Pattyn, F., Tusnády, G., De Paepe, A., Speleman, F., Arányi, T., and Vandesompele, J. (2010). methGraph: a genome visualization tool for PCR-based methylation assays. *Epigenetics.* 16;5(2), 159-63.
- Lehnertz, B., Ueda, Y., Derijck, AA., Braunschweig, U., Perez-Burgos, L., Kubicek, S., Chen, T., Li, E., Jenuwein, T., and Peters, AH. (2003). Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr. Biol.* 13, 1192-1200.

- Li, E., and Bird, A. (2007). DNA methylation in mammals. In: Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D (eds) Epigenetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. pp 341-356.
- Liao, J., Yu, L., Mei, Y., Guarnera, M., Shen, J., Li, R., Liu, Z., and, Jiang, F. (2010). Small nucleolar RNA signatures as biomarkers for non-small-cell-lung cancer. *Mol.Cancer*. 9, 198.
- Lim, JT., Mansukhani, M., and Weinstein, IB. (2005). Cyclin-dependent kinase 6 associates with the androgen receptor and enhances its transcriptional activity in prostate cancer cells. *PNAS*. 102, 5156-61.
- Lin, SL., Chiang, A., Chang, D., and Ying, SY. (2008). Loss of mir-146a function in hormone-refractory prostate cancer. *RNA*. 14, 417-424.
- Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E., and Sattler, M. (2003). Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain. *Nature*. 426, 465-69.
- Liu, A., and Xu, X. (2011). MicroRNA isolation from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Methods Mol. Biol*. 724, 259-67.
- Lloyd, RV., Erickson, LA., Jin, L., Kulig, E., Qian, X., Cheville, JC. and Scheithauer BW. (1999). P27Kip1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. *Am.J.Pathol*. 154, 313-23.
- Loda, M., Cukor, B., Tam, SW., Lavin, P., Fiorentino, M., Draetta, GF., Jessup, JM., and Pagano, M. (1997). Increased proteasome-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat.Med*. 3(2), 231-4.
- Lodygin, D., Tarasov, V., Epanchintsev, A., Berking, C., Knyazeva, T., Körner, H., Knyazev, P., Diebold, J., and Hermeking, H. (2008). Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle*. 7, 2591-2600.
- Long, C., Yin, B., Lu, Q., Zhou, X., Hu, J., Yang, Y., Yu, F., and Yuan, Y. (2007). Promoter hypermethylation of the RUNX3 gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Invest*. 25, 685-690.
- Luger, K., Mäder, AW., Richmond, RK., Sargent, DF., and Richmond, TJ. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260.
- Lujambio, A., Calin, GA., Villanueva, A., Ropero, S., Sánchez-Céspedes, M., Bianco, D., Montuenga, LM., Rossi, S., Nicoloso, MS., Faller, WJ., Gallagher, WM., Eccles, SA., Croce, CM., and Esteller, M. (2008). A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 105(36), 13556-61.
- Ma, L., Teruya-Feldestein, J., and Weinberg, RA. (2007). Tumor invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*. 449, 682-89.

- Maddison, L.A., Sutherland, B.W., Barrios, R.J., and Greenberg, N.M. (2004). Conditional deletion of Rb causes early stage prostate cancer. *Cancer Res.* 64, 6018-25.
- Marks, L.S., Fradet, Y., Deras, I.L., Blase, A., Mathis, J., Aubin, S.M., Cancio, A.T., Desaulniers, M., Ellis, W.J., Rittenhouse, H., and Groskop, F.J. (2007). PCA3 molecular urine assay for prostate cancer in men undergoing repeat biopsy. *Urology.* 69(3), 532-5.
- Martens-Uzunova, E.S., Jalava, S.E., Dits, N.F., van Leenders, G.J., Møller, S., Trapman, J., Bangma, C.H., Litman, T., Visakorpi, T., and Jenster, G. (2011). Diagnostic and prognostic signatures from the small non-coding RNA transcriptome in prostate cancer. *Oncogene.* Jul 18 2011[Epub ahead of print].
- Martin, M.M., Lee, E.J., Buckenberger, J.A., Schmittgen, T.D., and Elton, T.S. (2006). MicroRNA-155 regulates human angiotensin II type 1 receptor expression in fibroblasts. *J.Biol.Chem.* 281, 18277-84.
- Matsunaga, S., Iguchi, K., Usui, S., and Hirano, K. (2007). Incadronate induces cell detachment and apoptosis in prostatic PC-3 cells. *Anticancer Res.* 27(2), 927-32.
- McDonnell, T.J., Troncoso, P., and Brisbay, S.M. (1992). Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res.* 52, 6940-44.
- McNeal, J.E. (1978). Origin and evolution of benign prostatic enlargement. *Invest. Urol.* 15, 340-345.
- Meng, F., Henson, R., Lang, M., Wehbe, H., Maheshwari, S., Mendell, J.T., Jiang, J., Schmittgen T.D., and Patel, T. (2006). Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology.* 130, 2113-29.
- Meng, F., Henson, R., Wehbe-Janek, H., Ghoshal, K., Jacob, S.T., and Patel, T. (2007). MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology.* 133, 647-58.
- Mercatelli, N., Coppola, V., Bonci, D., Miele, F., Costantini, A., Guadagnoli, M., Bonanno, E., Muto, G., Frajese, G.V., De Maria, R., Spagnoli, L.G., Farace, M.G., and Ciafrè, S.A. (2008). The inhibition of the highly expressed miR-221 and miR-222 impairs the growth of prostate carcinoma xenografts in mice. *PLoS One.* 3, e4029.
- Mestdagh, P., Feys, T., Bernard, N., Guenther, S., Chen, C., Speleman, F., and Vandesompele, J. (2008). High-throughput stem-loop RT-qPCR miRNA expression profiling using minute amounts of input RNA. *Nucleic Acids Res.* 36(21), e143.
- Mestdagh, P., Van Vlierberghe, P., De Weer, A., Muth, D., Westermann, F., Speleman, F., and Vandesompele, J. (2009). A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol.* 10(6), R64.

- Metzler, M., Wilda, M., Busch, K., Viehmann, S., and Borkhardt, A. (2004). High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 39, 167-9.
- Michael, MZ., O'Connor, SM., van Holst Pellekaan, NG., Young, GP., and James, RJ. (2003). Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol. Cancer Res.* 12, 882-91.
- Millar, DS., Ow, KK., Paul, CL., Russell, PJ., Molloy, PL. and Clark, SJ. (1999). Detailed methylation analysis of the glutathione S-transferase, π (GSTP1) gene in prostate cancer. *Oncogene*. 18, 1313-24.
- Miranda. <http://www.microrna.org/microrna/searchMirnas.do>
- Miyamoto, S., Yagi, H., Yotsumoto, F., Horiuchi, S., Yoshizato, T., Kawarabayashi, T., Kuroki, M., and Mekada, E. (2007). New approach to cancer therapy: heparin binding-epidermal growth factor-like growth factor as a novel targeting molecule. *Anticancer Res.* 27(6A), 3713-21.
- Monkley, SJ., Pritchard, CA., and Critchley, DR. (2001). Analysis of the mammalian talin2 gene TLN2. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 286(5), 880-5.
- Montironi, R., Mazzucchelli, R., Algaba, F., Bostwick, DG., and Krongrad, A. (2000). Prostate-specific antigen as a marker of prostate disease. *Virchows Arch.* 436, 297-304.
- Morris, MJ., and Scher, HI. (2000). Novel strategies and therapeutics for the treatment of prostate carcinoma. *Cancer*. 89(6), 1329-48.
- Morris, MJ., and Scher, HI. (2002). Novel therapies for the treatment of prostate cancer: current clinical trials and development strategies. *Surgical Oncology*. 11, 13-23.
- Moss, EG., Lee, RC., and Ambros, V. (1997). The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the lin-4 RNA. *Cell*. 88, 637-46.
- Mossman, D., Kim, KT., and Scott, RJ. (2010). Demethylation by 5-aza-2'-deoxycytidine in colorectal cancer cells targets genomic DNA whilst promoter CpG island methylation persists. *BMC Cancer*. 10, 366.
- Murakami, Y., Yasuda, T., Saigo, K., Urashima, T., Toyoda, H., Okanoue, T., and Shimotohno, K. (2006). Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene*. 25(17), 2537-45.
- Murchison, EP., and Hannon, GJ. (2004). MiRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 16(3), 223-9.
- Nakayama, K., Ishida, N., Shirane, M., Inomata, A., Inoue, T., Shishido, N., Horii, I., and Loh, DY. (1996). Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyper-plasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell*. 85, 707-20.

Nan, X., Ng, HH., Johnson, CA., Laherty, CD., Turner, BM., Eisenman, RN., and Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*. 393, 386-389.

National Cancer Of Institute. www.ncri.org.uk

Nelson, P., Kiriakidou, M., Sharma, A., Maniataki, E., and Mourelatos, Z. (2003). The microRNA world: small is mighty. *Trends Biochem. Sci.* 28, 534-40.

Nelson, WG., De Marzo, AM., and Isaacs, WB. (2003). Prostate cancer. *New England Journal of Medicine*. 349, 366-81.

Neves, AF., Araújo, TG., Biase, WK., Meola, J., Alcântara, TM., Freitas, DG., and Goulart, LR. (2008). Combined analysis of multiple mRNA markers by RT-PCR assay for prostate cancer diagnosis. *Clin.Biochem.* 41(14-15), 1191.

Nguyen, CT., Weisenberger, DJ., Velicescu, M., Gonzales, FA., Lin, JC., Liang, G., and Jones, PA. (2002). Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cell and is rapidly reversed by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res.* 62(22), 6456-61.

O'Donnel, KA., Wentzel, EA., Zeller, KI., Dang, CV., and Mendell, JT. (2005). C-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*. 435, 839-43.

O'Dowd, GJ., Veltri, RW., Miller, MC., Strum, SB. (2011). The gleason score: a significant biologic manifestation of prostate cancer aggressiveness on biopsy. <http://www.prostatecancer.org/pcricms/node/165>. Accessed 12/7/2011.

Oki, Y., Jelinek, J., Kantarjian, HM., and Issa, JP. (2008). Induction of hypomethylation and molecular response after decitabine therapy in patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 111(4), 2382-4.

Okano, M., Bell, DW., Haber, DA., and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for *de novo* methylation and mammalian development. *Cell*. 99, 247-257.

Otto, SJ., and De Koning, HJ. (2004). Update on screening and early detection of prostate cancer. *Current Opinion on urology*. 14, 151-156.

Ozen, M., Creighton, CJ., Ozdemir, M., and Ittmann, M. (2008). Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. *Oncogene*. 27, 1788-1793.

Pagano, M., Tam, SW., Theodoras, AM., Beer-Romero, P., Del Sal, G., Chau, V., Yew, PR., Draetta, GF., and Rolfe, M. (1995). Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science*. 269, 682-85.

Palo Alto Medical Foundation (2011). Stages of Prostate cancer. <http://www.pamf.org/prostate/about/stages.html>. Accessed 12/7/2011.

Papsidero, LD., Kuriyama, M., Wang, MC., Horoszewicz, J., Leong, SS., Valenzuela, L., Murphy GP., and Chu, TM. (1981). Prostate antigen: a marker for human prostate epithelial cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 66, 37-42.

Park, JK., Henry, JC., Jiang, J., Esau, C., Gusev, Y., Lerner, MR., Postier, RG., Brackett, DJ., and Schmittgen, TD. (2011). Mir-132 and miR-212 are increased in pancreatic cancer and target the retinoblastoma tumor suppressor. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 406(4), 518-23.

Pavicic, W., Perkiö, E., Kaur, S., and Peltomäki, P. (2011). Altered methylation at microRNA-associated CpG islands in hereditary and sporadic carcinomas: a methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA)-based approach. *Mol.Med.* 17(7-8), 726-35.

Pelengaris, S., Khan, M., and Evan, GI. (2002). Suppression of Myc-induced apoptosis in β cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression. *Cell.* 109, 321-34.

Pellegrini, M., and Stasser, A. (2011). Caspases, Bcl-2 Family Proteins and Other Components of the Death Machinery: Their Role in the Regulation of the Immune Response. *Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6432/>. Accesso: 19/7/2011.

Peltier, HJ., and Latham, GJ. (2008). Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA.* 14(5), 844-52.

Pestell, RG., Albanese, C., Reutens, AT., Segall, JE., Lee, RJ., and Arnold, A. (1999). The cyclins and cyclin dependent kinase inhibitors in hormonal regulation of proliferation and differentiation. *Endocrine Rev.* 20, 501-34.

Petersen, CP., Bordeleau, ME., Pelletier, J., and Sharp, PA. (2006). Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol.Cell.* 21(4), 533-42.

Petre-Draviam, CE., Cook, SL., Burd, CJ., Marshall, TW., Wetherill, YB., and Knudsen, KE. (2003). Specificity of cyclin D1 for androgen receptor regulation. *Cancer Res.* 63(16), 4903-13.

PicTar. <http://pictar.bio.nyu.edu/>.

Piml, J., and Sorm, F. (1964). Decitabine. *Coll.Czech.Chem.Comm.* 29, 2576.

Portela, A., and Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nat.Biotechnol.* 28(10), 1057-68.

Prendergast, GC., and Ziff, EB. (1991). Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c- Myc basis region. *Science.* 251, 186-189.

- Qiao, D., Zeeman, AM., Deng, W., Looijenga, LH., and Lin, H. (2002). Molecular characterization of hiwi, a human member of the piwi gene family whose overexpression is correlated to seminomas. *Oncogene*. 21, 3988-99.
- Rainier, S., Johnson, LA., Dobry, CJ., Ping, AJ., Grundy, PE., and Feinberg, AP. (1993). Relaxation of imprinted genes in human cancer. *Nature*. 362(6422), 747-9.
- Reinhart, BJ., Slack, FJ., Basson, M., Pasquinelli, AE., Bettinger, JC., Rougvie, AE., Horvitz, HR., and Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 403, 901-6.
- Rideout, WM. III, Coetzee, GA., Olumi, AF., and Jones, PA. (1990). 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science*. 249, 1288-90.
- Riggs AD., and Jones, PA. (1983). 5-methylcytosine, gene regulation, and cancer. *Adv. Cancer Res*. 40, 1-30.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, JL., and Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*. 14, 1902-1910.
- Rodriguez, J., Frigola, J., Vendrell, E., Risques, RA., Fraga, MF., Morales, C., Moreno, V., Esteller, M., Cappelà, G., Ribas, M., and Peinado, MA. (2006). Chromosomal instability correlates with genome-wide DNA demethylation in human primary colorectal cancers. *Cancer Res*. 1;66(17), 8462-9468.
- Saini, HK., Griffiths-Jones, S., and Enright, AJ. (2007). Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc. Natl., Acad. Sci. USA*. 104(45), 17719-24.
- Saito, Y., Liang, G., Egger, G., Friedman, JM., Chuang, JC., Coetzee, GA., and Jones, PA. (2006). Specific activation of microRNAs-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell*. 9, 435-43.
- Sakamoto, S., McCann, RO., Dhir, R., and Kyprianou, N. (2010). Talin1 promotes tumor invasion and metastasis via focal adhesion signaling and anoikis resistance. *Cancer Res*. 70(5), 1885-95.
- Sakamoto S., and Kyprianou N., (2010). Targeting *anoikis* resistance in prostate cancer metastasis. *Mol.Aspects.Med*. 31(2), 205-14.
- Santini, V., Kantarjian, HM., and Issa, JP. (2001). Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications. *Ann. Intern. Med*. 134(7), 573-86.
- Sauntharajah, Y., Hillery, CA., Lavelle, D., Molokie, R., Dorn, L., Bressler, L., Gavazova, S., Chen, YH., Hoffman, R., and De Simone, J. (2003). Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on fetal hemoglobin levels, red cell adhesion, and hematopoietic differentiation in patients with sickle cell disease. *Blood*. 102(12), 3865-70.

- Schetter, AJ., Leung, SY., Sohn, JJ., Zanetti, KA., Bowman, ED., Yanaihara, N., Yuen, ST., Chan, TL., Kwong, DL., Au, GK., Liu, CG., Calin, GA., Croce, CM., and Harris, CC. (2008). MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA*. 299(4), 425-36.
- Schwarz, DS., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, PD. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 115(2), 199-208.
- Scott, WW., Menon, M., and Walsh, PC. (1980). Hormonal therapy of prostatic cancer. *Cancer*. 45(7 Suppl), 1929-36.
- Scott, GK., Mattie, MD., Berger, CE., Benz, SC., and Benz, CC. (2006). Rapid alteration of microRNA levels by histone deacetylase inhibition. *Cancer Res*. 66, 1277-81.
- Scott, GK., Goga, A., Bhaumik, D., Berger, CE., Sullivan, CS., and Benz, CC. (2007). Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b. *J.Biol.Chem*. 282, 1479-1486.
- Selen Systems. http://www.methods.info/Methods/DNA_methylation/Bisulphite_sequencing.html
- Sevli, S., Uzumcu, A., Solak, M., Ittmann, M., and Ozen, M. (2010). The function of microRNAs, small but potent molecules, in human prostate cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. 13, 208-217.
- Sgambato, A., Cittadini, A., Faraglia, B., and Weinstein, IB. (2000). Multiple functions of p27Kip1 and its alterations in tumor cells. *J. Cell. Physiol*. 183, 18-27.
- Shao, C., Sun, W., Tan, M., Glazer, CA., Bhan, S., Zhong, X., Fakhry, C., Sharma, R., Westra, WH., Hoque, MO., Moskaluk, CA., Sidransky, D., Califano, JA., and Ha, PK. (2011). Integrated, genome-wide screening for hypomethylated oncogenes in salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Clin. Cancer Res*. 17(13), 4320-30.
- Sharma, S., Kelly, TK., and Jones, PA. (2010). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 31(1), 27-36.
- Sheaff, RJ., Groudine, M., Gordon, M., Roberts, JM., and Clurman, BE. (1997). Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev*. 11, 1464-78.
- Sherr, CJ. (1996). Cancer cell cycles. *Science*. 284, 1672-77.
- Sherr, CJ., and Roberts, JM. (1999). CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 13, 1501-12.
- Shi, Y. (2007). Histone lysine demethylases: emerging roles in development, physiology and disease. *Nat. Rev. Genet*. 8, 829-833.

- Shi, XB., Xue, L., Yang, J., Ma, AH., Zhao, J., and Xu, M., Tepper, CG., Evans, CP., Kung, HJ., and deVere White, RW. (2007). An androgenregulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; *104*, 19983-19988.
- Si, ML., Zhu, S., Wu, H., Lu, Z., Wu, F., and Mo, YY. (2007). miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*. *26*, 2799-2803.
- Slingerland, J., and Pagano, M. (2000). Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J. Cell. Physiol.* *183*(1), 10-7.
- Song, JJ., Liu, J., Tolia, NH., Schneiderman, J., Smith, SK., and Martienssen, RA. (2003). The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nature Struct.Biol.* *10*, 1026-32.
- Song, JJ., Smith, SK., Hannon, GJ., and Joshua-Tor. (2004). Crystal structure of the Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*. *305*, 1434-1437.
- Stone, KR., Mickey, DD., Wunderli, H., Mickey, GH., and Paulson, DF. (1978). Isolation of human prostate carcinoma cell line (DU145). *Int. J. Cancer*. *21*, 274-281.
- Sun, H., Lesche, R., Li, DM., Liliental, J., Zhang, H., Gao, J., Gavrilova, N., Mueller, B., Liu, X., and Wu, H. (1999). PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *PNAS*. *96*, 6199-204.
- Suzuki, H., Freije, D., and Nusskern, DR. (1998). Interfocal heterogeneity of PTEN/MMAC1 gene alterations in multiple metastatic human prostate cancer tissue. *Cancer Res*. *58*, 204-9.
- Suzuki, MM., and Bird, A. (2008). DNA methylation landscape: provocative insights from epigenomics. *Nat.Rev.Genet.* *9*, 465-476.
- Tachibana, M., Matsumura, Y., Fukuda, M., Kimura, H., and Shinkai, Y. (2008). G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription. *EMBO J*. *27*, 2681-2690.
- Takai, D., and Jones, PA. (2002). Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. *99*, 3740-3745.
- Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Harano, T., Yatabe, Y., Nagino, M., Nimura, Y., Mitsudomi, T., Takahashi, T. (2004). Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res*. *64*(11), 3753-6.
- Tam, W., Ben-Yehuda, D., and Hayward, WS. (1997). Bic, a novel gene activated by proviral insertions in avian leucosis virus-induced lymphomas, is likely to function through its noncoding RNA. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 1490-502.

Taplin, ME., and Balk, SP. (2004). Androgen receptor: a key molecule in the progression of prostate cancer to hormone independence. *Journal of Cellular Biochemistry*. 91, 483-90.

TargetScan. <http://www.targetscan.org/>.

Taylor, BS., Schultz, N., Hieronymus, H., Gopalan, A., Xiao, Y., Carver, BS. Arora, VK., Kausshik, P., Cerami, E., Reva, B., Antipin, Y., Mitsiades, N., Landers, T., Dolgalev, I., Major, JE., Wilson, M., Socci, ND., Lash, AE., Heguy, A., Eastham, JA., Scher, HI., Reuter, VE., Scardino, PT., Sander, C., Sawyers, CL., and Gerald, WL. (2010). Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell*. 18(1), 11-22.

Thirlwell, C., Eymard, M., Feber, A., Teschendorff, A., Pearce, K., Lechner, M., Widschwendter, M., and Beck, S. (2010). Genome-wide DNA methylation analysis of archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue using the Illumina Infinium HumanMethylation27 BeadChip. *Methods*. 52(3), 248-54.

Thomson, JM., Newman, M., Parker, JS., Morin-Kensicki, EM., Wright, T., and Hammond, SM. (2006). Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev*. 20, 2202-07.

Tørring, N., Jørgensen, PE., Sørensen, BS., and Nexø, E. (2000). Increased expression of heparin binding EGF (HB-EGF), amphiregulin, TGF alpha and epiregulin in androgen-independent prostate cancer cell lines. *Anticancer Res*. 20(1A), 91-5.

Tsai, KW., Wu, CW., Hu, LY., Li, SC., Liao, YL., Lai, CH., Kao, HW., Fang, WL., Huang, KH., Chang, WC, and Lin, WC. (2011). Epigenetic regulation of miR-34b and miR-129 expression in gastric cancer. *Int. J. Cancer*. 129(11), 2600-10.

Tsihlias, J., Kapusta, LR., DeBoer, G., Morava-Protzner, I., Zbieranowski, I., Bhattacharia, N., Catzavelos, GC., Klotz, LH., and Slingerland, JM. (1998). Loss of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is a novel prognostic factor in localized human prostate adenocarcinoma. *Cancer Res*. 58, 542-48.

Tsihlias, J., Kapusta, L., and Slingerland, J. (1999). The prognostic significance of altered cyclindependent kinase inhibitors in human cancer. *Annu. Rev. Med*. 50, 401-23.

Ueda, T., Bruchovsky, N., and Sadar, MD. (2002). Activation of the androgen receptor N-terminal domain by interleukin 6 via MAPK and STAT3 signal transduction pathways. *J. Biol. Chem*. 277, 7076-85.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 3(7), RESEARCH0034.

van den Berg, A., Kroesen, BJ., Kooistra, K., de Jong, D., Briggs, J., Blokzijl, T., Jacobs, S., Kluiver, J., Diepstra, A., Maggio, E., and Poppema, S. (2003). High expression of B-cell receptor inducible gene BIC in all subtypes of Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 37, 20-28.

- Vivanco I., and Sawyers, CL. (2002). The phosphatidylinositol 3_kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2, 489-501.
- Vincent, A., Omura, N., Hong, SM., Jaffe, A., Eshleman, J., and Goggins, M. (2011). Genome-wide analysis of promoter methylation associated with gene expression profile in pancreatic adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* 17(13), 4341-54.
- Vlach, J., Hennecke, S., and Amati, B. (1997). Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *EMBO J.* 16, 5334-44.
- Vlietstra, RJ., van Alewijk, DC., Hermans, KG., van Steenbrugge, GJ., and Trapman, J. (1998). Frequent inactivation of PTEN in prostate cancer cell lines and xenografts. *Cancer Res.* 98, 2720-23.
- Vogt, M., Munding, J., Grüner, M., Liffers, ST., Verdoodt, B., Hauk, J., Steintraesser, L., Tannapfel, A., and Hermeking, H. (2011). Frequent concomitant inactivation of miR-34a and miR-34b/c by CpG methylation in colorectal, pancreatic, mammary, ovarian, urothelial, and renal cell carcinomas and soft tissue sarcomas. *Virchows Arch.* 458(3), 313-22.
- Volinia, S., Calin, GA., Liu, CG., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., Prueitt, RL., Yanaihara, N., Lanza, G., Scarpa, A., Vecchione, A., Negrini, M., Harris, CC., and Croce, CM. (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *PNAS.* 103, 2257-61.
- Wang, Y., and Leung, FC. (2004). An evaluation of new criteria for CpG islands in the human genome as gene markers. *Bioinformatics.* 20, 1170-1177.
- Wang, J., Hevi, S., Kurash, JK., Lei, H., Gay, F., Bajko, J., Su, H., Sun, W., Chang, H., Xu, G., Gaudet, F., Li, E., and Chen, T. (2009). The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. *Nat. Genet.* 41, 125-129.
- Watt, F., and Molloy, PL. (1988). Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev.* 2, 1136-1143.
- Weber, B., Stresemann, C., Brueckner, B. and Lyko, F. (2007). Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle.* 2;6(9), 1001-5.
- Weigelt, B., Peterse, JL., and van't Veer, LJ. (2005). Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat. Rev. Cancer.* 5, 591-602.
- Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell.* 75, 855-62.
- Wilson, AS., Power, BE., and Molloy, PL. (2007). DNA hypomethylation and human disease. *Biochem. Biophys. Acta.* 1775(1), 138-62.

- Woods, K., Thomson, JM. and Hammond, SM. (2007). Direct regulation of an oncogenic micro-RNA cluster by E2F transcription factors. *J. Biol. Chem.* 282, 2130-34.
- Wolff, EM., Byun, HM., Han, HF., Sharma, S., Nichols, PW., Siegmund, KD., Yang, AS., Jones, PA., Liang, G. (2010). Hypomethylation of a LINE-1 promoter activates an alternate transcript of the MET oncogene in bladders with cancer. *PloS. Genet.* 22;6(4), e1000917.
- Wong, TS., Liu, XB., Chung-Wai Ho, A., Po-Wing Yuen, A., Wai-Man Ng., R., and Ignace Wei, W. (2008). Identification of pyruvate kinase type M2 as potential oncoprotein in squamous cell carcinoma of tongue through microRNA profiling. *Int. J. Cancer.* 123(2), 251-7.
- Wu, Y., Crawford, M., Yu, B., Mao, Y., Nana-Sinkam, SP., and Lee, LJ. (2011). MicroRNA Delivery by Cationic Lipoplexes for Lung Cancer Therapy. *Mol. Pharm.* 2011 Jun. 20 [Epub ahead of print].
- Yanaihara, N., Caplen, N., Bowman, E., Seike, M., Kumamoto, K., Yi, M., Stephens, RM., Okamoto, A., Yokota, J., Tanaka, T., Calin, GA., Liu, CG., Croce, CM., and Harris, CC. (2006). Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell.* 9(3), 189-98.
- Yang, RM., Naitoh, J., Murphy, M., Wang, HJ., Phillipson, J., deKernion, JB., Loda, M., and Reiter, RE. (1998). Low p27 expression predicts poor disease-free survival in patients with prostate cancer. *J. Urol.* 159, 941-45.
- Yekta, S., Shih, IH., and Bartel, DP. (2004). MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science.* 304, 594-6.
- Yilmaz, M., and Christofori, G. (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 28, 15-33.
- Yoon, S., Choi, YC., Lee, S., Jeong, Y., Yoon, J., and Baek, K. (2010). Induction of growth arrest by miR-542-3p that targets survivin. *FEBS Lett.* 584(18), 4048-52.
- Zeng, Y., and Cullen, BR. (2003). Sequence requirements for microRNA processing and function in human cells. *RNA.* 9, 175-79.
- Zhang, X., Jiang, G., Cai, Y., Monkley, SJ., Critchley, DR., and Sheetz, MP. (2008). Talin depletion reveals independence of initial cell spreading from integrin activation and traction. *Nat.Cell.Bio.* 10, 1062-1068.
- Zhang, S., Hao, J., Xie, F., Hu, X., Liu, C., Tong, J., Zhou, J., Wu, J., Shao, C. (2011). Downregulation of miR-132 by promoter methylation contributes to pancreatic cancer development. *Carcinogenesis.* 32(8), 1183-9.
- Zhao, Q., Rank, G., Tan, YT., Li, H., Moritz, RL., Simpson, RJ., Cerruti, L., Curtis, DJ., Patel, DJ., Allis, CD., Cunningham, JM., and Jane, SM. (2009). PRMT5-mediated methylation of histone H4R3 recruits DNMT3A, coupling histone and DNA methylation in gene silencing. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 16, 304-311.

Zhu, S., Si, ML., Wu, H., and Mo, YY. (2007). MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene Tropomyosin 1 (TPM1). *J.Biol.Chem.* 282, 14328-36.

Ziegler, DS., Kung, AL., and Kieran, MW. (2008). Anti-apoptosis mechanisms in malignant gliomas. *J.Clin.Oncol.* 26(3), 493-500.

Zoghbi, HY., and Beaudet, AL. (2007). Epigenetics and human disease. In: Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D (eds) *epigenetics*, Cold Spings Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. pp 435-456.

§ VII. PUBBLICAZIONI

1)

Oncogene (2012) 1–8
© 2012 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 0950-9232/12
www.nature.com/onc



SHORT COMMUNICATION

DNA methylation silences miR-132 in prostate cancer

A Formosa¹, AM Lena², EK Markert³, S Cortelli¹, R Miano⁴, A Mauriello⁵, N Croce¹, J Vandesompele^{6,7}, P Mestdagh⁶, E Finazzi-Agrò⁴, AJ Levine^{3,8}, G Melino², S Bernardini¹ and E Candi²

Silencing of microRNAs (miRNAs) by promoter CpG island methylation may be an important mechanism in prostate carcinogenesis. To screen for epigenetically silenced miRNAs in prostate cancer (PCa), we treated prostate normal epithelial and carcinoma cells with 5-aza-2'-deoxycytidine (AZA) and subsequently examined expression changes of 650 miRNAs by megaplex stemloop reverse transcription-quantitative PCR. After applying a selection strategy, we analyzed the methylation status of CpG islands upstream to a subset of miRNAs by methylation-specific PCR. The CpG islands of miR-18b, miR-132, miR-34b/c, miR-148a, miR-450a and miR-542-3p showed methylation patterns congruent with their expression modulations in response to AZA. Methylation analysis of these CpG islands in a panel of 50 human prostate carcinoma specimens and 24 normal controls revealed miR-132 to be methylated in 42% of human cancer cases in a manner positively correlated to total Gleason score and tumor stage. Expression analysis of miR-132 in our tissue panel confirmed its downregulation in methylated tumors. Re-expression of miR-132 in PC3 cells induced cell detachment followed by cell death (anoikis). Two pro-survival proteins—heparin-binding epidermal growth factor and TALIN2—were confirmed as direct targets of miR-132. The results of this study point to miR-132 as a methylation-silenced miRNA with an antimetastatic role in PCa controlling cellular adhesion.

2)

Neuropeptide Y Protects Rat Cortical Neurons against β -Amyloid Toxicity and Re-establishes Synthesis and Release of Nerve Growth Factor

Nicoletta Croce,[†] Maria Teresa Ciotti,[‡] Francesca Gelfo,[†] Silvia Cortelli,[§] Giorgio Federici,[§] Carlo Caltagirone,[†] Sergio Bernardini,[§] and Francesco Angelucci^{*,†}

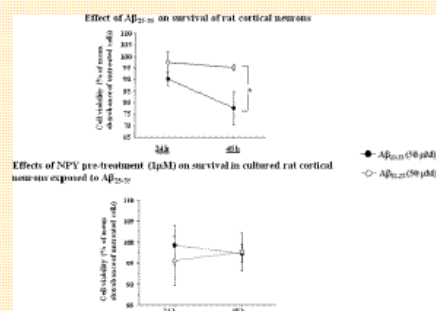
[†]IRCCS Santa Lucia Foundation, Rome, Italy

[‡]Institute of Cellular Biology and Neurobiology, National Council of Research, Rome, Italy

[§]Department of Internal Medicine, Tor Vergata University, Rome, Italy

ABSTRACT: Neuropeptide Y (NPY) is a 36 amino acid peptide, widely distributed within central nervous system neurons. More recently, it has been shown that NPY is involved in Alzheimer's disease (AD), a disorder characterized by accumulation of amyloid β -peptide ($A\beta$) in neurons. In a previous study, we investigated the effect of NPY on neuronal damage by exposing SH-SY5Y cells (an established human derived neuroblastoma cell line) to $A\beta$'s pathogenic fragment 25–35 ($A\beta_{25-35}$). We found a NPY-neuroprotective action associated with changes in intracellular production of nerve growth factor (NGF), a member of the neurotrophin family. Since our results were encouraging, we decided to replicate our data using primary cortical neurons cultured in presence of $A\beta_{25-35}$, and investigated whether NPY had similar neuroprotective action. Moreover, since cortical neurons are able to produce and release NGF, we investigated whether the synthesis and release of NGF were modified in such experimental conditions. Our results showed that a preincubation with NPY counteracted the toxic effect of $A\beta$, as measured by increased cell viability. Moreover, NPY pretreatment had an effect on NGF since its intracellular synthesis was increased, release was normalized, and mRNA expression was downregulated. Notably, these effects on NGF were in the opposite direction of those produced by incubating the cells with $A\beta$ alone. This study in primary cortical neurons supports the hypothesis that NPY may be a neuroprotective agent against β -amyloid neurotoxicity. These data also suggest that NPY may influence the synthesis and the release of NGF by cortical neurons.

KEYWORDS: NPY, β -amyloid, primary cells, cerebral cortex, NGF, cortical neurons



§ VIII. PROGRAMMI DI RICERCA NAZIONALI E INTERNAZIONALI

1. Chromatin remodelling and human disease workshop Dicembre 3-4 2009 I.F.O. via delle Messi D'Oro 156, 00158 Roma-Italy.
2. International conference in memory of Judah Folkman update on Angiogenesis: translation research Rome, 15-16 Gennaio 2010 NH Hotel Vittorio Veneto Roma-Italy.
3. 52nd Annual Meeting of the Italian Cancer Society LOST IN TRANSLATION: bridging the gap between cancer research and effective therapies, Rome 4-7 Ottobre 2010 Università Pontificia Largo Angelicum, 1 Rome-Italy.
4. Course "Database per la Ricerca Biomedica" Rome 3-5th Novembre CASPUR
5. 42^o Congresso Nazionale SIBIOC. Roma, 05-08 Ottobre 2010.
6. International conference in memory of Judah Folkman update on Angiogenesis:

- translation research Roma, 14-15 Gennaio 2011 NH Hotel Vittorio Veneto Roma-Italy.
7. 1st Annual Workshop on Cancer Systems Biology of Tumor Dormancy. 25-28 Luglio 2011 Boston, Massachusetts, USA.
 8. IV International conference on Angiogenesis in memory of Judah Folkman. Roma, Gennaio 13-14, 2012 NH Hotel Vittorio Veneto.
 9. Attestato di partecipazione “Quality Management Associate s.a.s”: Corso sulla Buona Pratica Clinica-GCP. 28/11/12 ore 9:30 Aula Bendazac-Lisina Angelini Acraf S.P.A., S.Palomba (Pomezia).
 10. Attestato di partecipazione “New perspectives of Pharmacovigilance”. 06/12/12 ore 9:00 Aula Auditorium Angelini Acraf S.P.A., S. Palomba (Pomezia).
 11. V international conference in memory of Judah Folkman: Translational studies on angiogenesis Roma, 19 Gennaio 2013 NH Hotel Vittorio-Veneto Roma-Italy.

§ IX. PARTECIPAZIONI A CONGRESSI (ABSTRACT)

1. International conference in memory of Judah Folkman update on Angiogenesis: translation research Roma, Gennaio 15-16, 2010 NH Hotel Vittorio Veneto (Roma).
2. Seminario di Genetica Medica “ Genome wide association studies in pancreatic cancer from association signals to functional understanding”. Lau Fey Amunda’s Dottir Laboratory of translational Genomics Division of Cancer Epidemiology and Genetics National Cancer Institute 30/03/10 ore 12:00 Aula Fleming c/o la Facoltà di medicina e Chirurgia Via Montpellier 1, 00133 Roma.
3. Seconda Giornata della di Ricerca di Ateneo, Biotecnologie a Tor Vergata 16/06/10 ore 9:30 Aula Fleming c/o la Facoltà di Medicina e Chirurgia Via Montpellier 1, 00133 Roma.
4. Senescence-Associate infiammatori secretion in Response to DNA double strand breaks: Good or Bad? 28/07/10 ore 12:00 Aula 1B5 c/o Facoltà di Medicina e Chirurgia Tor Vergata Via Montpellier 1, 00133 Roma.
5. 52nd Annual Meeting of the Italian Cancer Society LOST IN TRANSLATION: bridging the gap between cancer research and effective therapies, Roma 4-7 Ottobre 2010 Università Pontificia Largo Angelicum, 1 (Roma).
6. Corso “Database per la Ricerca Biomedica” Roma 3-5 Novembre 2010 CASPUR (Roma).
7. III International conference in memory of Judah Folkman update on Angiogenesis: translation research Roma, Gennaio 14-15, 2011 NH Hotel Vittorio Veneto (Roma).
8. Seminario di Bioetica: “Nuove tecnologie in sanità risvolti economici e sociali” 01/04/11 ore 14:00 Aula Golgi c/o la Facoltà di Medicina e Chirurgia Università Tor Vergata Via Montpellier 1, 00133 Roma.
9. Seminario “Role of Glucose in keratinocyte differentiation” ore 10:30AM Sala

Riunioni, Settore E, Il piano c/o la Facoltà di Medicina e Chirurgia Università Tor Vergata Via Montpellier 1, 00133 Roma.

10. Seminario Medicina dello Sport: Premio Internazionale Prof. Jens Bangsho Dep. Of Exercise and Sport Science Univ Copenhagen; Saluto del Magnifico Rettore dell'Università degli Studi di Roma Tor Vergata. Intervengono Giuseppe Novelli, Davide Lauro, Stefano D'Ottavio, Carlo Castagna, Gaetano Barbato, Danila Moscone. Moderano Valerio Iafrate, Giancarlo De Sisti. Conclude Antonio Lombardo. Coordina Sergio Bernardini. 10/05/11 ore 9:00 Aula Fleming c/o la Facoltà di Medicina e Chirurgia Università Tor Vergata Via Montpellier 1, 00133 Roma.
11. Seminario Intramurale: "The Role of p53 and p73 in germ line genetic stability" Prof. Arnold J. Levine 12/05/11 ore 11:00 Aula Fleming c/o la Facoltà di Medicina e Chirurgia Università Tor Vergata Via Montpellier 1, 00133 Roma.
12. Workshop "La Fase Preliminare" Medical Anthropology in Health Care. Progetto sperimentale di ricerca-azione partecipata finalizzata all'integrazione nel Servizio Sanitario Nazionale degli immigrati, dei Rom e delle fasce emarginate della periferia romana afferenti al PTV. 14/06/11 ore 12:00 Aula Fleming c/o la Facoltà di Medicina e Chirurgia Università Tor Vergata Via Montpellier 1, 00133 Roma.
13. Seminario Intramurale Viterbo: "Tecnologia delle fermentazioni: dai laboratori di ricerca alle applicazioni industriali per lo sviluppo e produzione di vaccini" Dr.ssa Anna Maria Colucci, PhD-Novartis vaccines Institute for Global Health s.r.l. (NVGH), Siena. 15/06/11 ore 11:30 Aula 1 Blocco B Facoltà di Scienze MM., FF., e NN Università La Tuscia (Viterbo).
14. 1st Annual Workshop on Cancer Systems Biology of Tumor Dormancy. 25-28 Luglio 2011 Boston, Massachusetts, USA.
15. Seminario 5a giornata della Ricerca Scientifica: Hematopoietic progenitor kinase-1 (HPK1)- A molecular switch between life and death T-Cells. Dr. Dirk Brenner Division of Immunogenetics- DKFZ-German Cancer Research Center in the Hemolt Association Toronto Canada. 27/09/11 ore 9.00-13:00 Aula Golgi c/o Facoltà di Medicina e Chirurgia Università di Tor Vergata Roma Italy.
16. Seminario Intramurale Viterbo: "Next Generation Sequencing applicato alla Genomica Funzionale". 30/09/11 ore 09:30 Aula 1 Blocco B ex Facoltà di Scienze MM., FF., e NN Università La Tuscia, Viterbo.
17. Seminari intramurali Dipartimento Biochimica Clinica PTV per dottorandi e specializzandi. "Il punto sul Congresso SIBioC di Parma" Dr.ssa Porzio. 15/12/12 ore 14:00-16:00 stanza 148 del Laboratorio di Biochimica Clinica del PTV.
18. Seminari intramurali Dipartimento Biochimica Clinica PTV per dottorandi e specializzandi. "Introduzione alla spettrometria di massa" Dr. Ialongo. 11/01/12 ore 14:00-16:00 Aula 1B3 c/o facoltà di Medicina e Chirurgia Università Tor Vergata Via Montpellier 1, 00133 Roma.
19. IV International conference on Angiogenesis in memory of Judah Folkman. Roma, Gennaio 13-14, 2012 NH Hotel Vittorio Veneto (Roma).

20. Seminari intramurali Dipartimento Biochimica Clinica PTV per dottorandi e specializzandi. “Il Laboratorio delle malattie autoimmuni sistemiche” Dr.ssa Morello e Dr.ssa Nuccetelli. “Le cellule staminali” Prof. Isacchi. 17/01/12 ore 14:00-16:00 Aula 1B3 c/o facoltà di Medicina e Chirurgia Università Tor Vergata Via Montpellier 1, 00133 Roma.
21. Seminari intramurali Dipartimento Biochimica Clinica PTV per dottorandi e specializzandi. “Esempi di applicazioni cliniche della spettrometria di massa (LC/MS)” Dr.ssa Mozzi. “Anemie emolitiche” Prof. G. Adorno. 24/01/12 ore 14:00-16:00 Aula 1B3 c/o facoltà di Medicina e Chirurgia Università Tor Vergata Via Montpellier 1, 00133 Roma.
22. Seminari intramurali Dipartimento Biochimica Clinica PTV per dottorandi e specializzandi. “La diagnostica del diabete monogenico” Prof. Barbetti. “Criopreservazione delle cellule staminali” Prof. Zinno. 01/01/12 ore 14:00-16:00 Aula 1B3 c/o facoltà di Medicina e Chirurgia Università Tor Vergata Via Montpellier 1, 00133 Roma.
23. Seminari intramurali Dipartimento Biochimica Clinica PTV per dottorandi e specializzandi. “La biologia molecolare dei chimerismi in oncoematologia” Dr.ssa Rapanotti. “piastrinopenie e Prognosi” Prof. Isacchi. 15/01/12 ore 14:00-16:00 Aula 1B3 c/o facoltà di Medicina e Chirurgia Università Tor Vergata Via Montpellier 1, 00133 Roma.
24. The mouse mammary carcinoma 4T1: characterization and MCP-1 role, Dr.ssa Anna di Matteo. 09/03/12 ore 11:00-13:00 Sala Bendazac-Lisina Angelini Acraf S.P.A , S. Palomba (Pomezia).
25. Flow Cytometric analysis of Pheripheral blood, spleen, bone marrow and tumor cell populations in a 4T1 tumor-bearing mice model, Dr.ssa Noemi D’Atanasio. 09/03/12 ore 11:00-13:00 Sala Bendazac-Lisina Angelini Acraf S.P.A , S. Palomba (Pomezia).
26. Gene expression and signalling pathway studies in models of neurodegeneration and psychiatric disorders. 15/03/12 ore 11:00 Aula Auditorium Angelini Acraf S.P.A , S. Palomba (Pomezia).
27. Study of serotonergic mechanisms involved in the homeostatic regulation of serotonergic neuron firing and in the therapeutic action of anti-depressant drugs. 15/03/12 ore 12:00 Aula Auditorium Angelini Acraf S.P.A , S. Palomba (Pomezia).
28. Data quality in due diligences (DD) of R&D projects and technologies, Dr. Alberto Bernareggi Director, Pharmaceutical R&D, IBSA- Institut Biochimique SA (CH). 16/03/12 ore 11:00 Aula Auditorium Angelini Acraf S.P.A , S. Palomba (Pomezia).
29. Corso Sicurezza di Laboratorio per il personale di Laboratorio. “Rischio Chimico” 27/04/12 ore 9:00-11:30 Aula Bendazac-Lisina Angelini Acraf S.P.A , S. Palomba (Pomezia).
30. NAD metabolism as a novel target in cancer and inflammation, Prof. Armando Genazzani, Professore Ordinario di Farmacologia, Department of Pharmaceutical Sciences, Università degli Studi del Piemonte Orientale “Amedeo Avogadro” Vercelli, Novara, Alessandria. 27/04/12 ore 11:30 Aula Auditorium Angelini Acraf S.P.A , S. Palomba (Pomezia).

31. Congresso SITOX. 04/05/12 ore 9:45-15:45 Aula Auditorium Angelini Acraf S.P.A., S. Palomba (Pomezia).
32. Corso Sicurezza di Laboratorio per il personale di Laboratorio. “DPI-Dispositivi di protezione individuale- Normative e sicurezze” 11/05/12 ore 9:15-12:00 Aula Bendazac-Lisina Angelini Acraf S.P.A , S. Palomba (Pomezia).
33. Corso Sicurezza di Laboratorio per il personale di Laboratorio. “Etichetatura” 18/05/12 ore 9:00 Aula Auditorium Angelini Acraf S.P.A , S. Palomba (Pomezia).
34. Corso Sicurezza di Laboratorio per il personale di Laboratorio. “Sessione informativa e dimostrativa utilizzo dell’archivio Schede di Sicurezza (MSDS) su e-Room” 15/06/12 ore 10:00-11:00 Aula Auditorium Angelini Acraf S.P.A , S. Palomba (Pomezia).
35. Intellectual Property Day:a) Corso base brevetti 18/06/12 ore 9:15-10:45 Aula Bendazac-Lisina Angelici Acraf S.P.A, S. Palomba (Pomezia). b) Seminario “Proprietà intellettuale” 18/06/12 ore 11:15-13:00 Aula Auditorium Angelici Acraf S.P.A., S. Palomba (Pomezia).
36. Corso Sicurezza di Laboratorio per il personale di Laboratorio. “a) Disposizioni generali sulla sicurezza sul lavoro; b) Rischi specifici della mansione e conseguenti misure e procedure di prevenzione e protezione; c) Rischio VDT, altri rischi non specifici, emergenza.” 12/07/12 ore 9:00-16:00 Aula Auditorium Angelini Acraf S.P.A , S. Palomba (Pomezia).
37. The “pain matrix” model reloaded, Dr. Giandomenico Iannetti, Department of Neuroscience, Physiology and Pharmacology, University of College London (UK). 12/10/12 ore 11:30-13:00 Aula Auditorium Angelini Acraf S.P.A., S.Palomba (Pomezia).
38. Attestato di partecipazione “Quality Management Associate s.a.s”: Corso sulla Buona Pratica Clinica-GCP. 28/11/12 ore 9:30 Aula Bendazac-Lisina Angelini Acraf S.P.A., S.Palomba (Pomezia).
39. Attestato di partecipazione “New perspectives of Pharmacovigilance”. 06/12/12 ore 9:00 Aula Auditorium Angelini Acraf S.P.A., S. Palomba (Pomezia).
40. IV International conference on Angiogenesis in memory of Judah Folkman Roma, Gennaio 13-14, 2012 NH Hotel Vittorio Veneto (Roma).

§ X. RINGRAZIAMENTI

Dopo aver svolto anni di intenso lavoro, desidero rivolgere un sentito grazie al Prof. Sergio Bernardini, che con le sue capacità, la sua gentilezza e la sua grande umanità mi ha costantemente seguita e mi ha permesso di lavorare in un ambiente sereno e stimolante.

Vorrei inoltre ringraziare i Professori Giorgio Federici, Gerry Melino ed Eleonora Candi per la loro preziosa collaborazione nella realizzazione dei progetti; il Prof. Andrea Urbani per avermi dato l'opportunità di avvicinarmi agli aspetti della Proteomica Funzionale e alla loro applicazione pratica consentendomi di svolgere alcuni progetti nel suo laboratorio.

Desidero anche ringraziare il coordinatore del corso di Dottorato in Genetica e Biologia Cellulare dell'Università La Tuscia (Viterbo), Prof. Giorgio Prantera che ha fornito a noi giovani ricercatori un supporto valido per la formazione e la crescita professionale.

Un ringraziamento particolare va alla Dr.ssa Nicoletta Croce che mi ha guidato e mi ha continuamente sostenuta.

Desidero ringraziare tutti i miei colleghi che hanno collaborato con me in questi anni: Dr. Paolo Gravina, Dr.ssa Amanda Formosa, Dr. Muragan Kalimutho, Dr.ssa Giulia Sancesario, Dr. Vincenzo Dinallo e tutti i colleghi del laboratorio di Proteomica che hanno più strettamente lavorato con me. Un grazie va anche a tutto lo staff del laboratorio di Biologia Cellulare e Molecolare Clinica del Policlinico Tor Vergata.

Un ringraziamento speciale va ai miei genitori che, nonostante le difficoltà e le situazioni di dolore che abbiamo dovuto superare, hanno saputo sempre andare avanti a testa alta e farmi cogliere gli aspetti più belli della vita, riuscendo a trasmettermi la serenità e a farmi sorridere insegnandomi a non arrendermi mai di fronte agli ostacoli, perché l'impegno costante prima o poi verrà premiato.

“Grazie mamma e papà, vi voglio bene”. Desidero ringraziare anche chi per cause di forza maggiore non è più qui, mia nonna e mio zio Franco perché l'essere arrivati dove si è dipende anche da chi ci ha insegnato i valori della vita. *“Grazie nonna, grazie zio, vi custodirò sempre dentro di me, vi voglio bene”.*

Ringrazio tutti i miei familiari perché malgrado gli alti e i bassi, i momenti belli e quelli brutti mi sono sempre vicini e sono per me un sicuro punto di riferimento. Ringrazio anche tutti i miei amici per i preziosi consigli e la loro vicinanza.