

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO
DIPARTIMENTO DI SCIENZE ECOLOGICHE E BIOLOGICHE (DEB)

Corso di Dottorato di Ricerca in
Genetica e Biologia Cellulare Ciclo XXVII

“INDIVIDUAZIONE DI EVENTI MOLECOLARI SISTEMICI DURANTE LA
TUMORIGENESI MAMMARIA UTILI ALL’IDENTIFICAZIONE
DI BIOMARCATORI TUMORALI PRECOCI”

(s.s.d. BIO/11)

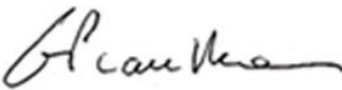
Tesi di dottorato di:

Dott. ssa Isabella Manni



Coordinatore del corso

Prof. Giorgio Prantera



Tutore

Dott. ssa Giulia Piaggio



INDICE

INTRODUZIONE	4
CAPITOLO 1. MODELLI ANIMALI	4
1.1 MODELLI ANIMALI PER XENOTRAPIANTI	5
1.2 MODELLI ANIMALI TRANSGENICI	5
1.2.1 Topo transgenico bioluminescente: topo MITO-Luc “reporter” di proliferazione	6
1.2.2 Topo transgenico per lo studio del carcinoma mammario: MMTV–NeuT	7
CAPITOLO 2. IL CARCINOMA MAMMARIO	9
2.1 STRUTTURA E SVILUPPO DELLA GHIANDOLA MAMMARIA	9
2.2 RUOLO DEI RECETTORI TIROSIN-CHINASICI DELLA FAMIGLIA ERBB	11
2.3 TUMORIGENESI MAMMARIA	12
2.4 CLASSIFICAZIONE MOLECOLARE DEL CARCINOMA MAMMARIO	14
2.5 IL PROTO-ONCOGENE ERBB2	17
CAPITOLO 3 IL CANCRO E' UNA MALATTIA SISTEMICA	18
CAPITOLO 4. I MICRORNA	19
4.1 microRNA COME POSSIBILI BIOMARCATORI TUMORALI	22
4.1.1 Deregolata espressione di miRNA oncogeni ed oncosoppressori nel carcinoma mammario	23
4.1.2 La famiglia dei miRNA let-7	24
4.1.3 Il cluster let-7c -99° -125b	27
4.1.4 miR 99a	28
4.1.5 miR-125a e miR-125b	28
OBIETTIVI DEL LAVORO	29
MATERIALI E METODI	30
□ Condizioni di stabulazione degli animali	30
□ Accoppiamento degli animali	30
□ Genotipizzazione degli animali	30
□ Imaging BioLuminescente (BLI) <i>in vivo</i> ed <i>ex vivo</i>	31

□ Prelievo di sangue e preparazione di siero	32
□ Autopsie	33
□ Preparazione del pellet cellulare da midollo osseo	33
□ Prelievi e separazione cellulare	33
□ Analisi citofluorimetrica e separazione cellulare	33
□ Estrazione di RNA da tessuto	33
□ Preparazione del cDNA	34
□ Real-Time PCR (qRT-PCR)	35
□ Analisi Statistica	37
RISULTATI	38
□ “Imaging” del tessuto mammario nel modello animale MITO+/NeuT+ durante la progressione neoplastica	38
□ “Imaging” della proliferazione cellulare sistemica nel modello animale MITO+/NeuT+ durante la progressione neoplastica	41
□ Analisi immunofenotipica delle cellule del midollo osseo e della milza nelle fasi precoci della progressione tumorale	44
□ Raccolta di biopsie liquide e solide nel modello animale MITO+/NeuT+ durante la progressione neoplastica	44
□ Livelli di espressione di specifici microRNA nella progressione del carcinoma mammario	44
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	49
BIBLIOGRAFIA	51

INTRODUZIONE

CAPITOLO 1. MODELLI ANIMALI

Nella ricerca oncologica assume un ruolo sempre più importante lo sviluppo e l'applicazione di modelli sperimentali animali per lo studio della progressione del cancro e per la valutazione della risposta terapeutica (figura 1).

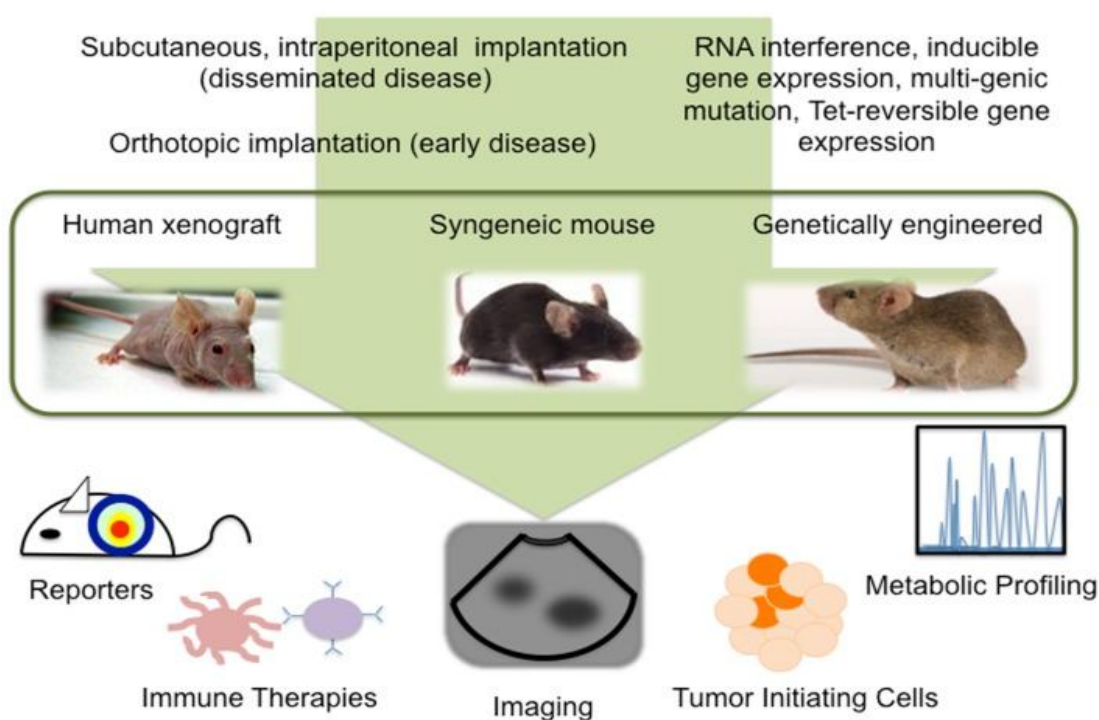


Figure 1. Modelli Animali nella ricerca oncologica. Schema che mostra l'applicazione dei modelli animali integrati alle tecniche di immunoterapia, di Imaging molecolare e di metabolomica, nel campo della ricerca oncologica.

Un modello ideale dovrebbe fornire una riproduzione fedele del tumore umano sia dal punto di vista fenotipico che da quello molecolare. La patologia dovrebbe svilupparsi all'interno di un contesto anatomico corretto, circondato da un microambiente tumorale appropriato e da un sistema immunitario funzionale. Inoltre, un modello ideale dovrebbe contenere l'assortimento delle alterazioni geniche alla base dell'insorgenza del tumore umano e dovrebbe poter riprodurre l'intero spettro della malattia e dei suoi sottotipi ed infine presentare lo stesso "pattern" di metastatizzazione osservabile nei pazienti.

1.1 MODELLI ANIMALI PER XENOTRAPIANTI

Tra i modelli animali che trovano largo impiego nella ricerca oncologica ci sono gli “xenograft”. La messa a punto di linee e di biopsie tumorali umane primarie ha aperto la strada per lo studio dei tumori umani in altre specie viventi ovviando al problema del rigetto della massa inoculata a causa della risposta immunitaria dell’ospite. Gli esemplari animali usati, infatti sono stati manipolati per avere un deficit nel sistema immunitario per lo più nella componente linfoide. Ad oggi i più utilizzati risultano i topi nudi: animali in cui la rimozione del timo comporta immunodeficienza a livello di linfociti T in aggiunta alla perdita totale del pelo (caratteristica da cui deriva il nome topi nudi) e i topi SCID (*Severe Combined ImmunoDeficient*) risultato di alterazioni genetiche che si riflettono in un’assenza di linfociti B e T e di cellule Natural Killer (NK).

I modelli Xenograft si dividono in:

- Modelli ***Xenograft ectotopici*** (*Ectotopic*)
- Modelli ***Xenograft ortotopici*** (*Orthotopic*)

La differenza sostanziale tra i due risulta esclusivamente nella localizzazione della massa tumorale inoculata: Gli xenograft ectotopici fanno riferimento ad un trapianto in una sede diversa rispetto alla sede di provenienza. Il termine ortotopico definisce invece un trapianto di materiale che, nel trasferimento da donatore a ricevente, viene mantenuto nella medesima localizzazione anatomica di provenienza. Il modello ortotopico sotto questo punto di vista risulta più predittivo. Questo modello permette di compiere degli studi che più si avvicinano a quelli osservati in un quadro clinico riducendo di gran lunga i falsi positivi associati a una sperimentazione farmacologica. Lo studio condotto da De Rose e colleghi nel 2011, ha analizzato 12 “xenografts” generati mediante trapianto seriale di biopsie appartenenti a pazienti affetti da diversi sottotipi di carcinoma mammario, caratterizzati in base alla presenza dei recettori ormonali (ER, PR e HER2), al potenziale metastatico ed alla presenza di delezioni o amplificazioni geniche. Questa ricerca ha dimostrato che esiste un alto grado similitudine tra il tumore generato mediante trapianto e quello originato nel paziente.

1.2 MODELLI ANIMALI TRANSGENICI

L’avvento del gene-targeting e dell’ingegneria genetica ha portato alla generazione di modelli animali che ricapitolano importanti aspetti dei tumori umani (Cheon&Orsulic, 2011). I topi geneticamente modificati (GEMMs) offrono numerosi vantaggi per lo studio dei meccanismi molecolari alla base della patogenesi del cancro: a) i topi sono generati in maniera tale da

presentare specifiche mutazioni geniche, notoriamente associate alla cancerogenesi umana, che mediante tecniche di ricombinazione del DNA e/o di espressione genica inducibile possono essere espresse in maniera tessuto specifica e regolata dal punto di vista temporale (Van Dyke&Jacks, 2002); b) i topi geneticamente modificati sono ospiti immunocompetenti e ciò permette di mantenere le complesse interazioni che avvengono tra le cellule tumorali ed il sistema immunitario (Egeblad *et al.*, 2010); c) lo sviluppo del tumore è spontaneo e spesso procede ripercorrendo le fasi di progressione in modo simile a quello osservato nei tumori umani (Lin *et al.*, 2003; Yamada&Mori, 2007). I GEMMs, sono, dunque, diventati un mezzo sempre più utilizzato per esaminare le modalità attraverso cui una o più combinazioni di mutazioni influenzano la progressione neoplastica, particolarmente adatto per sezionare il ruolo di eventi molecolari specifici coinvolti nella tumorigenesi.

Per questo lavoro di tesi assumono particolare importanza i modelli animali che si basano sull'utilizzo dell'ingegneria genica: i topi transgenici.

1.2.1 Topo transgenico bioluminescente: topo MITO-Luc “reporter” di proliferazione

La tecnica della BioLuminescenza non Invasiva (BLI) *in vivo*, utilizzata al posto di analisi morfologiche ed immunoistochimiche su tessuti fissati, è il futuro della diagnostica non invasiva anche in campo oncologico. In particolare nella ricerca oncologica la possibilità di avere modelli animali in cui è possibile visualizzare processi biologici fondamentali quali la proliferazione, il differenziamento e l'apoptosi in animali vivi permette di avere una misura quantitativa della progressione tumorale.

NF-Y è un fattore trascrizionale ubiquitario, formato da un complesso eterotrimerico, che si lega con elevata affinità alla sequenza consenso CCAAT presente su molti promotori dei geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare e su molti promotori di microRNA che regolano la proliferazione (Elkon *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2008). NF-Y esercita la sua attività solo in cellule proliferanti e non è attivo in cellule post-mitotiche (Gurtner *et al.*, 2003; Manni *et al.*, 2008). Il ruolo chiave di NF-Y nella proliferazione cellulare è anche dimostrato dal fatto che la sua inattivazione nel topo è letale (Bhattacharya *et al.*, 2003).

Utilizzando una cassetta in cui un promotore, la cui attività trascrizionale dipende da NF-Y, trascrive il gene della luciferasi, è stato prodotto un topo transgenico. In questo modello murino tutte le cellule che esprimono la luciferasi emettono luce quando vengono a contatto con il substrato della luciferasi, la luciferina. Infatti, in questi topi dopo iniezione intraperitoneale di luciferina è possibile visualizzare eventi di proliferazione nel topo intero attraverso la tecnica

della BioLuminescenza non Invasiva (BLI) che consiste nel riprendere con una telecamera altamente sensibile topi addormentati (figura 2).

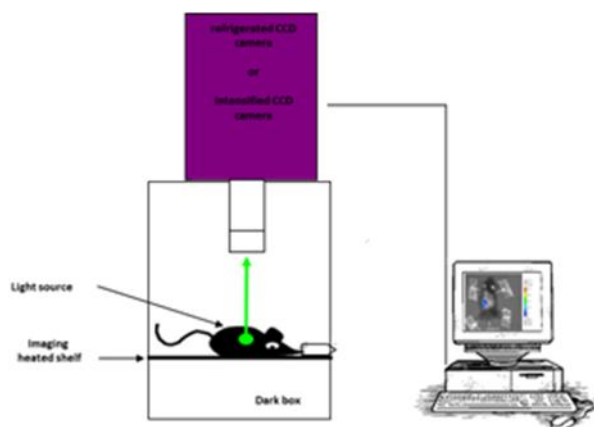


Figura 2. Illustrazione esemplificativa dell'utilizzo della tecnica dell'imaging. In figura viene mostrata la scatola nera all'interno della quale viene inserito l'animale addormentato, l'orientamento della telecamera e quello del fascio di fotoni emessi dall'animale. È inoltre raffigurato schematicamente il computer in cui è presente il software utilizzato per l'analisi della luminescenza.

Il modello animale è stato chiamato MITO-Luc dove MITO sta per mitosi. In questi topi è possibile visualizzare nel contesto dell'intero animale, lungo tutto l'arco della sua vita, senza dunque avere la necessità di sacrificarlo, cellule in attiva proliferazione durante lo sviluppo e nell'animale adulto. Analisi *in vivo*, *in vitro* ed *ex vivo* mostrano che il gene della luciferasi è espresso in organi altamente proliferanti, in particolare nel midollo osseo presente nei femori, nello sterno, nella colonna vertebrale, nella milza e nei testicoli. Tessuti diversi, come ad esempio polmone, cervello, cuore, aorta, muscolo scheletrico, fegato e rene non emettono luce. (Goeman *et al.*, 2012). Inoltre è stato dimostrato che in questo modello animale è possibile visualizzare eventi precoci di trasformazione cellulare indotta da carcinogeni come i papillomi cutanei indotti dal 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) e dal 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) (Goeman *et al.*, 2012).

1.2.2 Topo transgenico per lo studio del carcinoma mammario: MMTV-NeuT

In questo lavoro di tesi assume un ruolo di particolare importanza il modello transgenico Neu, ingegnerizzato al fine di ottenere una riproduzione *in vivo* del processo di tumorigenesi mammaria che si verifica in seguito ad un overespressione dell'oncogene ERBB2 (Siegel *et al.*, 2013). Lo studio condotto da Muller e colleghi (1988) ha fornito la prima evidenza sperimentale della correlazione tra l'attivazione dell'allele neu e l'induzione del carcinoma mammario. Nel

corso degli anni sono stati sviluppati numerosi modelli transgenici ma in questo lavoro di tesi la nostra attenzione sarà focalizzata sul modello murino MMTV–NeuT.

Nel modello animale oggetto dello studio, l'over-espressione dell'oncogene HER2 avviene in maniera tessuto-specifica selettivamente nelle cellule dell'epitelio della ghiandola mammaria. Studi precedenti avevano dimostrato l'esistenza di un virus specifico per la ghiandola mammaria: il Mouse Mammary Tumour Virus (MMTV). Quando i topi venivano infettati con questo retrovirus si osservava lo sviluppo del carcinoma mammario. Come tutti i retrovirus l'MMTV presenta delle Long Terminal Repeat (LTR) che fungono da promotore forte e sono responsabili dell'integrazione del genoma virale all'interno delle cellule ospiti e della sua conseguente replicazione. L'utilizzo del MMTV-LTR come promotore di uno specifico transgene ne causa un elevato livello di espressione nelle cellule luminali degli alveoli e dei dotti mammari in aggiunta a quelle mioepiteliali. Questa elevata espressione si registra durante tutti gli stadi di sviluppo della ghiandola mammaria e diviene detectabile tra il 6°-21° giorno dopo il parto, a seconda del sito di integrazione del genoma virale in quello della cellula ospite (Wagner *et al.*, 2001).

Nel 1988 Muller e colleghi hanno ingegnerizzato il modello transgenico che esprime la forma attivata dell'oncogene neu, HER2 nell'uomo, sotto il controllo del promotore virale dell'MMTV. I topi in questione sviluppano tumori mammari, che coinvolgono l'intero epitelio ghiandolare, nell'arco di soli 3 mesi (figura 3).

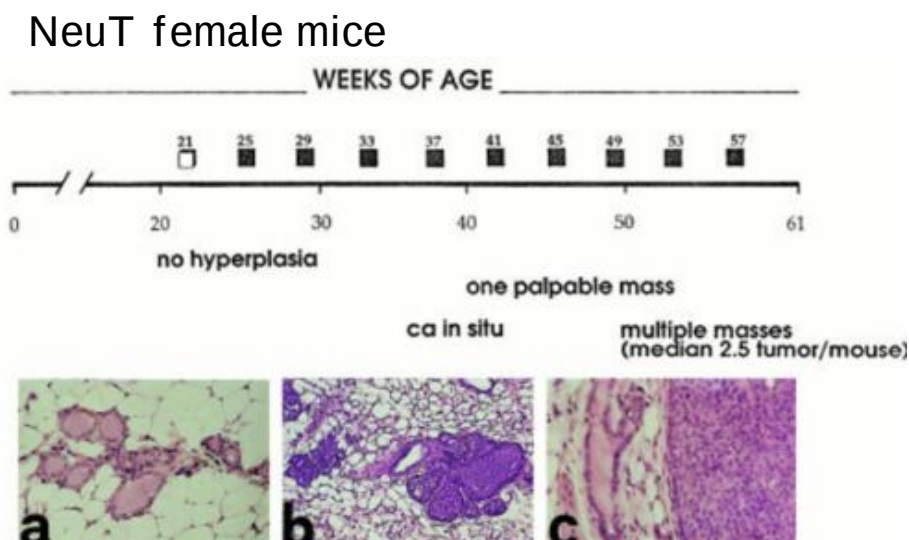


Figure 3. Progressione tumorale nei topi NeuT. In figura viene mostrata dal punto di vista istologico la progressione del tumore mammario in relazione alle settimane di vita del topo. Si noti che dalla 9^a settimana viene riscontrata un'iperplasia atipica della ghiandola mammaria; alla 15^a settimana si ha la formazione del carcinoma in situ, ma solo tra la 17^a e la 20^a settimana si riscontra la formazione di una massa palpabile. Se il topo viene portato oltre la trentesima settimana di vita il tumore insorge all'interno di tutte e 10 le mammelle.

Data la rapidità con cui insorgeva la neoplasia mammaria e, dato il coinvolgimento di molteplici mammelle, questo modello dimostra che l'overespressione dell'oncogene attivato neu richiede pochi eventi genetici per la trasformazione dell'epitelio mammario (Muller *et al.*, 1988).

Il modello MMTV-NeuT pur non riproducendo fedelmente la progressione del carcinoma mammario umano è uno strumento ideale per studiare la patogenesi di tumori iperesprimanti ERBB2. Infatti, lo studio del profilo dell'espressione genica dei tumori derivati da questo modello transgenico risulta essere ampiamente sovrapponibile a quella derivata dai tumori mammari umani ERBB2 positivi (Astolfi *et al.*, 2005).

CAPITOLO 2. IL CARCINOMA MAMMARIO

2.1 STRUTTURA E SVILUPPO DELLA GHIANDOLA MAMMARIA

La mammella è una ghiandola esocrina di tipo apocrino tipica dei mammiferi, con delle differenze specie-specifiche che riguardano il numero e la disposizione lungo l'asse del corpo. Nel topo, ad esempio sono presenti cinque paia di mammelle che si sviluppano lungo una linea che corre leggermente ventrale alle gemme degli arti (figura 4), mentre nell'uomo sono presenti solo un paio di mammelle situate nella regione toracica



Figura 4. Localizzazione delle ghiandole mammarie nel topo. In figura è mostrata una rappresentazione schematica della localizzazione delle ghiandole mammarie murine, di cui viene indicata la numerazione.

Questa ghiandola è formata, da due compartimenti cellulari distinti:

- il compartimento epiteliale, composto da cellule epiteliali che formano i dotti galattofori e da cellule alveolari responsabili della produzione del latte;
- il compartimento stromale, che costituisce la porzione strutturale della mammella ed ha funzione di sostegno.

La maggior parte delle cellule epiteliali, definite luminali, è costituita da cellule con attività secretiva, che durante la gravidanza subiscono il differenziamento funzionale necessario per la produzione del latte. Le cellule luminali sono rivestite da uno strato di cellule mioepiteliali, denominate cellule basali. Queste ultime presentano delle proprietà contrattili e partecipano alla secrezione del latte (Hennighausen *et al.*, 2005).

Durante lo sviluppo post-natale della ghiandola mammaria gran parte delle cellule epiteliali esprime i recettori per gli estrogeni (ER) e per il progesterone (PR) e la famiglia dei recettori tirosin-chinasici: ERBB. Queste due molecole biologiche sono gli ormoni che svolgono un'azione pleiotropica che interessa le ovaie, l'utero e l'asse ipotalamo-ipofisi, indispensabile nella regolazione dello sviluppo sessuale. Nella ghiandola mammaria gli estrogeni e il progesterone controllano rispettivamente la crescita dei dotti galattofori e l'espansione degli alveoli. Durante la pubertà la produzione ciclica di estrogeni e progesterone promuove ed accelera lo sviluppo dei dotti. I cambiamenti ormonali che avvengono in gravidanza aumentano la proliferazione delle cellule degli alveoli, che durante l'allattamento risultano maturi e le cellule luminali pronte a secernere le proteine del latte (Hennighausen *et al.*, 2005). Parte dell'azione degli estrogeni deriva dall'induzione dell'espressione dei recettori per il progesterone. Zeps e colleghi hanno dimostrato che l'espressione dei recettori per il progesterone viene indotta attraverso la segnalazione a valle dei recettori per gli estrogeni. Lo studio è stato condotto su tessuti mammari derivati dalle biopsie di femmine di topi Balb/c, allo stadio puberale (5^a settimana di vita) o topi adulti (10^a-12^a settimana di età) mai accoppiati (Zeps *et al.*, 1999). Gli ormoni estrogeni si legano a due distinti recettori, codificati da due geni differenti: ER α ed ER β . Come gli altri recettori steroidei, questi sono membri della grande famiglia dei recettori nucleari, che in seguito al legame con il proprio ligando, funzionano come fattori trascrizionali (Hennighausen *et al.*, 2005). Esperimenti di knock-out hanno dimostrato che ER α è necessario per l'allungamento e la crescita duttale sia nelle cellule che compongono la porzione stromale sia in quelle che costituiscono la porzione epiteliale (Bocchinfuso *et al.*, 2000). Il topo knock-out per ER β non ha, invece, alcun effetto sullo sviluppo duttale nè su quello alveolare, ma sembra però avere un ruolo fondamentale nell'organizzazione e nell'adesione delle cellule epiteliali, essendo coinvolto nel differenziamento terminale del tessuto mammario (Forster *et al.*, 2002). Mentre per i recettori progestinici esistono due isoforme (A e B) le cui assenze alterano lo sviluppo alveolare (Lydon *et al.*, 1999) anche se il topo knock-out selettivo dell'isoforma A, non influenza negativamente la maturazione degli alveoli. Questi dati suggeriscono che l'isoforma B è indispensabile affinché l'ormone possa effettuare la sua azione pro-proliferativa sulle cellule epiteliali (Mulac-Jericevic *et al.*, 2003). In maniera molto interessante, durante la gravidanza le

cellule positive per i recettori del progesterone si localizzano vicino alle cellule proliferanti, suggerendo il potenziale effetto paracrina di quest'ormone (Hennighausen *et al.*, 2005).

2.2 RUOLO DEI RECETTORI TIROSIN-CHINASICI DELLA FAMIGLIA ERBB

Il nome del gene *ERBB* deriva dall'oncogene virale Eritoblastic Leukemia, correlato ad esso. La famiglia dei recettori tirosin-chinasici ERBB è composta da quattro membri strutturalmente correlati, classificati nel modo seguente:

- **ERBB1;** (HER1 e EGFR)
- **ERBB2;** (HER2 nell'uomo e neu nel topo)
- **ERBB3;** (HER3)
- **ERBB4;** (HER4)

Questa famiglia di recettori è espressa ubiquitariamente nelle cellule epiteliali, nelle cellule mesenchimali, nelle cellule del sistema nervoso e nei loro progenitori. Dal punto di vista strutturale tutti i componenti di questa famiglia presentano un dominio extracellulare, una regione transmembrana ed il dominio intracellulare. Il dominio extracellulare ha quattro domini funzionali; il dominio I e III, ricchi in leucina, adibiti al legame con il ligando e i domini II e IV, ricchi in cisteina, coinvolti nella formazione di ponti disolfuro. Il dominio II assume un ruolo di particolare importanza nella formazione degli omodimeri e degli eterodimeri con gli altri membri della famiglia ERBB. La regione transmembrana è formata da 19-25 residui aminoacidici ed è essenziale per l'ancoraggio del recettore alla membrana plasmatica. Il dominio intracellulare formato da 550 residui, contiene il dominio chinamico e la porzione carbossiterminale (Roskoski *et al.*, 2014) (figura 5).

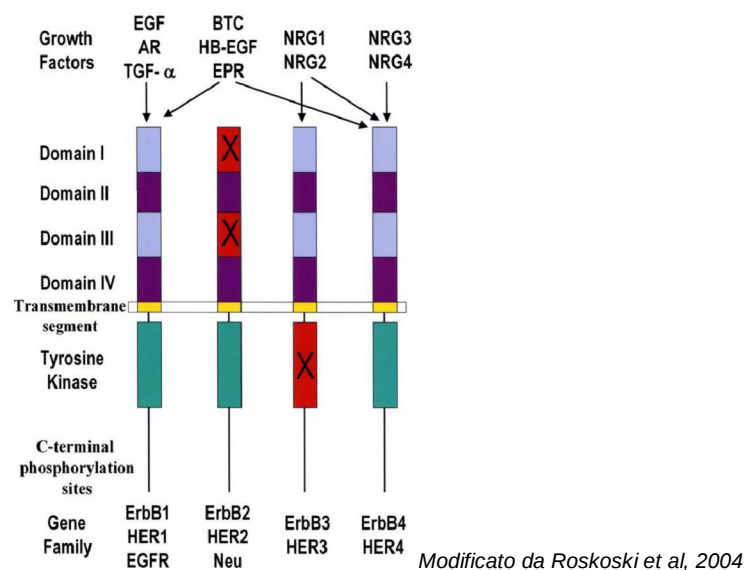


Figura 5. Organizzazione strutturale e funzionale dei recettori della famiglia ERBB. Suddivisione in domini funzionali dei membri della famiglia e rispettivi ligandi, fattori di crescita, della famiglia HER: l'Epidermal Growth Factor (EGF), il Transforming Growth Factor alpha (TGF α), l'Anfiredulina (AR), la Betacellulina (BTC), l'Epiregulina (EPR), la Neuregulina (Neu) e "Heparin-binding epidermal growth factor like" (HB-EGF). Nessuno di questi ligandi è specifico per la proteina HER2, mentre tutti e sette legano HER1 ed HER4 e solo due si legano ad HER3. Questi recettori per essere attivati hanno bisogno di dimerizzare. Quando il ligando si lega alla porzione extracellulare di HER3 causa un cambiamento conformazionale che permette l'esposizione del dominio di dimerizzazione. La formazione dell'eterodimero causa così la trans-fosforilazione del dominio chinasi intracellulare.

Come mostrato in figura 5 a seconda della combinazione dei fattori trascrizionali e del contesto cellulare in cui si trovano viene regolata la risposta cellulare. Il sistema mantiene due stati di equilibrio, la cui interconversione dipende dal legame con il ligando. Il corecettore ERBB2 agisce da regolatore positivo; l'eterodimerizzazione tra ERBB2 e uno qualsiasi degli altri membri della famiglia ERBB aumenta e prolunga la rispettiva risposta (Citri & Yarden, 2006).

Il ruolo di questi recettori nello sviluppo fisiologico della ghiandola mammaria è stato studiato a partire dagli anni 90 da Fowler e colleghi attraverso un modello murino (*waved-2 mice*), geneticamente ingegnerizzato per la presenza di una mutazione puntiforme inserita all'interno del gene codificante per l'ERBB1 (Fowler *et al.*, 1995). Analogamente l'espressione transgenica *in vivo* del recettore dominante negativo ERBB2 causa la mancata formazione di un compartimento alveolare funzionale (Jones *et al.*, 1999). Infine, lo studio condotto da Long e colleghi, ha suggerito che la delezione di ERBB4, effettuata attraverso il sistema di ricombinazione *Cre-Lox*, al fine di targhetare specificamente l'epitelio mammario, causa una riduzione della proliferazione delle cellule del compartimento alveolare (Long *et al.*, 2003).

2.3 TUMORIGENESI MAMMARIA

Il carcinoma mammario è il tumore maligno più frequente nelle donne. Per esempio, negli Stati Uniti d'America nell'anno 2013 sono stati diagnosticati 232.340 casi di cancro al seno (Shah *et al.*, 2014). Dopo il carcinoma polmonare, il carcinoma della mammella è la seconda causa di morte nella popolazione femminile (Siegel *et al.*, 2013) ed è una patologia eterogenea, caratterizzata da molti sottotipi tumorali con caratteristiche biologiche differenti correlate ad una risposta al trattamento ed esiti clinici altrettanto diversificati (Yersal *et al.*, 2014).

Nonostante si conoscano i molteplici fattori di rischio, una migliore comprensione dell'eziologia del tumore al seno sarebbe fondamentale sia per l'identificazione di nuove terapie sia allo scopo di migliorare le terapie esistenti per il trattamento e la prevenzione della malattia. Qui di seguito è riportata una lista dei fattori di rischio ritenuti più importanti nell'insorgenza della patologia:

- **Età:** il rischio di sviluppare un carcinoma mammario aumenta notevolmente con l'avanzare dell'età. Tramite l'utilizzo del database "Surveillance", "Epidemiology" and "End Results" (SEER) è stato stabilito che la probabilità che una donna, negli Stati Uniti, sviluppi

neoplasia mammaria è di 1/202 fino a 39 anni, 1/26 dai 40-59 anni e 1/28 dai 60-69 anni (Siegel *et al.*, 2013).

- **Storia personale:** una donna che è sopravvissuta ad un tumore al seno, presenta un maggior rischio di sviluppare una seconda lesione a carico della stessa mammella o più frequentemente a carico della mammella controlaterale. È stato stimato che il rischio di comparsa di un secondo tumore controlaterale varia da 2 a 5 volte rispetto al rischio di comparsa del tumore primitivo e rimane tale per circa 30 anni dalla prima diagnosi (Shah *et al.*, 2014).
- **Patologie mammarie:** esistono una serie di lesioni mammarie benigne che rappresentano un fattore di rischio per il cancro al seno. Tra queste quelle che conferiscono soltanto lieve aumento del rischio (circa 1,5-2 volte superiore a quello della popolazione generale) sono l'iperplasia duttale solida, i papillomi intraduttali ed i fibroadenomi. Tuttavia quando si riscontrano patologie mammarie più rare, come l'iperplasia atipica e il carcinoma lobulare in situ, il rischio relativo aumenta fino a 4,4 nel primo caso e fino a 12 nel secondo (Hartmann *et al.*, 2005).
- **Storia familiare:** numerosi studi clinici hanno dimostrato che donne con uno, due, tre o più parenti di primo grado affetti da carcinoma mammario, hanno rapporti di rischio più elevati (1,80 , 2,93 e 3,90 rispettivamente) rispetto alla popolazione generale (Colditz *et al.*, 2012)
- **Predisposizione genetica:** circa il 20-25% dei pazienti con tumore mammario ha una storia familiare positiva, ossia possiede parenti di primo grado affetti. Tuttavia, solo il 5-10% dei casi di cancro al seno sembra essere correlato ad un'eredità autosomica dominante (Shah *et al.*, 2014). In particolare, sono stati descritti, in termini di significatività, alcuni alleli di suscettibilità alla patologia. Tra questi, quelli che conferiscono il più alto rischio di sviluppare il cancro al seno sono BRCA1 e BRCA2 (BReast CANcer), mutazioni nel gene TP53 (sindrome di Li-Fraumeni), Phosphatase and tensin homolog (PTEN), Serine/Threonine Kinase 11 (STK11, neurofibromatosi (NF1)) e nel gene codificante per il marcatore epiteliale E-caderina (CDH-1) (Sharif *et al.*, 2007). Tra i geni che vengono definiti di rischio moderato, ossia del 20-40%, abbiamo le mutazioni omozigoti per il gene codificante la chinasi ATM (Atassia Telangectasia) (Thompson *et al.*, 2005), mutazioni somatiche nel gene antitumorale CHEK2 (checkpoint kinase 2) (Thompson *et al.*, 2006), mutazioni nei geni BRIP1 (BRCA1 interacting protein) e PALB2 (Partner and localizer of BRCA2) (Wong *et al.*, 2011). Attraverso studi di associazione genome-wide, sono stati definiti anche gli alleli a basso rischio, ma il loro ruolo nella cancerogenesi mammaria deve essere ancora chiarito (Shah *et al.*, 2014)

La prognosi delle pazienti con cancro al seno è fortemente associata alla diagnosi precoce e per questo l'identificazione di biomarcatori specifici per le prime fasi dello sviluppo del tumore diventa indispensabile per migliorare l'andamento della malattia. Sebbene i metodi ad oggi ampiamente utilizzati per la diagnosi, come la mammografia e la risonanza magnetica, abbiano aumentato il numero di diagnosi precoci, la sensibilità di questi sistemi resta bassa. Purtroppo attualmente il numero complessivo di biomarcatori disponibili, clinicamente utili, è ancora molto limitato. Il cancro al seno, sia nella specie umana che in quella murina, progredisce da lesioni precancerose non aggressive fino a divenire un carcinoma invasivo e metastatico. Le prime fasi, definite appunto pre-cancerose, consistono nell'insorgenza del carcinoma in situ. Tutto inizia grazie alla presenza di piccoli foci costituiti da cellule trasformanti all'interno dell'unità terminale duto-lobulare (la porzione finale del duto principale che si apre nel capezzolo, TEB). Questi foci si espandono fino a riempire interamente questa unità, ma non risultano invasivi poiché rimangono incapsulati all'interno della membrana basale dell'epitelio luminale. Quest'espansione è alla base dell'insorgenza dei carcinomi duttali in situ (DCIS) e dei carcinomi lobulari in situ (LCIS) a seconda delle caratteristiche morfologiche. Quando i DCIS vengono diagnosticati precocemente vengono rimossi tramite intervento chirurgico, ma se la diagnosi precoce non si verifica possono progredire fino ad arrivare allo stadio tumorale invasivo e metastatizzante. Quindi è chiaro che il successo del trattamento del cancro al seno è strettamente legato alla diagnosi precoce e vi è una necessità di biomarcatori di progressione tumorale diagnostici e/o prognostici utilizzabili in clinica. Nonostante l'enorme quantità di dati acquisiti dall'analisi genomica effettuata su linee cellulari o su tumori, il risultato netto in termini di indicatori clinicamente utili individuati è ancora molto limitata.

2.4 CLASSIFICAZIONE MOLECOLARE DEL CARCINOMA MAMMARIO

I sistemi di classificazione tradizionali si basano sulle caratteristiche biologiche come ad esempio le dimensioni del tumore, il coinvolgimento dei linfonodi, l'aspetto istologico, lo stato di attivazione dei recettori per gli estrogeni (ER), di quelli per il progesterone (PR) e dei recettori della famiglia ERBB (Yersal *et al.*, 2014). Lo sviluppo di nuove tecniche per lo studio dell'espressione genica ha reso possibile l'analisi contemporanea dell'espressione di migliaia di geni, rivoluzionando i criteri della classificazione del cancro al seno (Perou *et al.*, 2000; Naderi *et al.*, 2007; Wirapati *et al.*, 2008). Inoltre, questi studi hanno fornito importanti informazioni per la sua classificazione molecolare in sottotipi distinti sulla base dell'espressione di specifici geni correlati ad un preciso "outcome" clinico (Eroles *et al.*, 2012). Sulla base di questi studi è possibile classificare i tumori mammari in due grandi gruppi: ER-positivi ed ER-negativi. I

tumori ER-positivi sono caratterizzati da un'elevata espressione dei geni espressi dalle cellule dell'epitelio luminale del dotto mammario e per questo vengono definiti *luminal group*. I tumori ER-negativi invece, sono stati suddivisi in tre sottoclassi: *basal-like*, *normal-like* e *ERBB2-positivi*. Questi ultimi sono caratterizzati dall'iperespressione dell'oncogene HER2. I *basal-like* esprimono molte delle caratteristiche delle cellule che compongono l'epitelio basale della mammella e non esprimono i recettori ormonali. Infine i tumori *normal-like* che rappresentano solo il 5-10% dei tumori, sono poco caratterizzati. Questo sottogruppo presenta un'espressione genica correlata a quella del tessuto adiposo mammario ed una prognosi intermedia tra quella dei sottotipi *luminal* e *basal*. Data la mancanza dei recettori per gli estrogeni, per il progesterone e del recettore HER2, questi tumori vengono classificati come tripli-negativi (Yersal *et al.*, 2014).

La comparazione del profilo di espressione genica nei tumori classificati come *luminal group* ha permesso di classificare ulteriormente questo sottotipo tumorale (Sorlie *et al.*, 2001; Van't Veer *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2008; Sotiriou *et al.*, 2010). In particolar modo sono stati individuati altri due sottogruppi, chiamati Luminal-A e Luminal-B. I primi rappresentano quasi il 50-60% dei tumori mammari; sono caratterizzati da un fenotipo poco aggressivo, dimostrato anche attraverso studi di immunoistochimica per la proteina Ki-67 (Carey *et al.*, 2006), marcatore di proliferazione. I tumori Luminal-A sono correlati ad una prognosi favorevole e ad un altrettanto basso rischio di recidiva (Guarneri *et al.*, 2009; Kennecke *et al.*, 2010). Al contrario, i Luminal B comprendono il 15-20% dei tumori al seno, sono caratterizzati da un fenotipo molto aggressivo e una prognosi infausta (Creighton *et al.*, 2012). Recenti evidenze sperimentali suggeriscono che quest'alto tasso di proliferazione, sia dovuto all'attivazione di "pathways" alternativi in risposta alla produzione di specifici fattori di crescita. I tumori basal-like (ER-negativi), sono considerati carcinomi ad alto grado, dal punto di vista istologico si evidenziano delle zone centrali necrotiche o fibrotiche e la presenza di infiltrato linfocitario. La maggior parte di questi tumori è altamente infiltrante, ha un fenotipo estremamente aggressivo e favorisce la formazione di metastasi al cervello ed ai polmoni (Heitz *et al.*, 2009). Molti dei tumori che fanno parte di questo gruppo esprimono elevati livelli di marcatori mioepiteliali come le citocheratine 5, 14, 17 (CK5, CK14, CK17) e la laminina. I basal-like non esprimono né i recettori per il progesterone, né quelli per gli estrogeni e neanche quelli della famiglia ERBB, per questo vengono definiti anche tumori tripli-negativi. Tuttavia, è importante sottolineare che basal-like e triplo negativo, non sono in realtà sinonimi, infatti si evidenziano dei dati discordanti nel 20% degli studi che prendono in esame il profilo di espressione genica relativo ad entrambe le sottoclassi (Yersal *et al.*, 2014). Nei tumori basal-like è presente un alto tasso di mutazione a carico della proteina p53, correlato all'instabilità genomica e all'impossibilità nell'attivare il "pathway" a valle della

proteina Rb (Retinoblastoma), da cui consegue un importante deregolazione del ciclo cellulare ed un aumento della proliferazione. Inoltre, la deregolazione dell'espressione dei geni codificanti per le integrine viene correlata all'elevato potenziale metastatico di questa sottoclasse tumorale (Heitz *et al.*, 2009). Molti dei geni che sono normalmente mutati in altri tipi di cancro, lo sono anche nei tumori basal-like, ma l'accumulo nucleare e citoplasmatico della β -catenina che si evidenzia in questi tumori sembra rappresentare un ottimo bersaglio per lo sviluppo di terapie più mirate (Criscitiello *et al.*, 2012).

Importanti sono le implicazioni della classificazione molecolare nello sviluppo di nuove terapie. Infatti, nel 2013 alla St. Gallan International Breast Cancers Conference, i membri di una commissione di esperti hanno concordato che le decisioni terapeutiche devono essere basate sul riconoscimento dei sottotipi intrinseci di cancro al seno. La stessa commissione ha inoltre stabilito che la classificazione deve essere definita mediante l'utilizzo di tecnologie per l'analisi del profilo di espressione genica piuttosto che sulla base esclusiva degli studi immunohistochimici (Goldhirsch *et al.*, 2013) (Tabella 1).

Intrinsic subtype	Clinicopathological surrogate definition	
Luminal-A	"Luminal-A-like" all of: ER and PgR positive HER2 negative Ki-67 "low" ^a Recurrence risk "low" based on multi-gene-expression assay (if available) ^b	a A level of < 14% best correlated with the gene-expression definition of Luminal A based on the results in a single reference laboratory ^b PgR cut-point of $\geq 20\%$ to best correspond to Luminal A subtype
Luminal-B	Luminal-B-like (HER 2 positive) ER positive HER2 negative and at least one of: Ki-67 "high" PgR "negative or low" Recurrence risk "high" based on multi-gene-expression assay (if available)	
Erb-B2 overexpression	Luminal-B (HER 2 negative) ER positive HER2 over-expressed or amplified Any Ki-67 Any PgR HER 2 positive (non-luminal) HER2 over-expressed or amplified	
Basal-like	ER and PgR absent Triple negative (ductal) ER and PgR absent HER2 negative	There is an 80% overlap between "triple-negative" and intrinsic "basal-like" subtype

Tabella 1. Tabella riassuntiva dei sottotipi tumorali approvati dalla St. Gallan International Breast Cancers Conference del 2013

2.5 IL PROTO-ONCOGENE ERBB2

Molteplici evidenze sperimentali correlano l'amplificazione della regione genica del gene *ERBB2* alias *HER2* (chr17: 37856254-37884915) all'insorgenza di differenti tipi di cancro: il cancro alle ovaie, ai polmoni, al pancreas, al colon, all'endometrio e primo su tutti quello alla mammella (Citri & Yarden, 2006). Inoltre, l'iperespressione della proteina HER2 nel carcinoma mammario determina un aumento di aggressività tumorale, poiché l'amplificazione della segnalazione da esso indotta, incide sui processi cellulari che guidano la tumorigenesi quali l'invasione, la motilità cellulare, la proliferazione, la metastatizzazione, l'angiogenesi e l'apoptosi (Slamon *et al.*, 1989; Ross *et al.*, 2003). L'iperespressione di HER2 in linee cellulari o tessuti tumorali mammari induce la fosforilazione costitutiva del suo dominio chinasi determinando uno stato di costante attivazione (Alimandi *et al.*, 1995; Thor *et al.*, 2000). Inoltre, quando HER2 è iperespressa, essendo il miglior "partner" di dimerizzazione per gli altri membri della famiglia ERBB, si osserva anche un'attivazione aberrante degli altri "network" molecolari in cui questi sono coinvolti (Citri & Yarden, 2006). In particolare, se HER2 è iperespressa, nelle cellule di epitelio mammario, favorisce la formazione di colonie e induce la trasformazione neoplastica (Pierce *et al.*, 1991).

Per il presente lavoro di tesi di dottorato assume una particolare importanza il sottotipo tumorale HER2 positivo. Il 15-20% dei carcinomi mammari ER-negativi risultano essere HER2-positivi. Questi tumori sono caratterizzati da un'iperespressione della proteina HER2 e di altre proteine coinvolte nella sua via di segnalazione oppure dalla presenza di un'amplificazione della regione genica in cui mappa il gene codificante per HER2 (Yersal *et al.*, 2014). In questo sottotipo tumorale le copie geniche di HER2 possono arrivare fino a 25-50, il livello di espressione della proteina HER2 supera di 40-100 volte quello normale, ciò determina la presenza di più di 2 milioni di recettori espressi sulla superficie delle cellule tumorali (Kallioniemi *et al.*, 1992). L'amplificazione di HER2 è un evento relativamente precoce nella patogenesi del tumore al seno (Park *et al.*, 2006). Come mostrato in tabella 2 i tumori overesprimanti HER2 sono caratterizzati da un elevato grado di aggressività e sono correlati ad una prognosi infausta.

Increased proliferation rates
Increased proliferation rates
High histologic and nuclear grade
Low ER and PR levels
More aneuploidy
Propensity to metastasize to CNS and viscera
Relative resistance to endocrine therapy
Increased sensitivity to doxorubicin; Co-amplification of topoisomerase 2
Relative resistance to endocrine therapy
Response to HER2-targeted therapy

Tabella 2. Caratteristiche dei Tumori overesprimenti HER2.

CAPITOLO 3 IL CANCRO E' UNA MALATTIA SISTEMICA

Il microambiente tumorale è composto dalla matrice extracellulare e da tipi cellulari diversi come cellule del sistema immunitario e fibroblasti che cooperano per promuovere la sopravvivenza, la migrazione e l'invasione delle cellule tumorali. Il microambiente tumorale gioca un ruolo importante sia all'inizio che nella progressione tumorale. Nei primi stadi dello sviluppo del tumore, le cellule tumorali secernono fattori, come citochine, chemochine, e metaboliti che inducono una risposta immunitaria pro-tumorale. Infatti, i fattori solubili rilasciati alterano l'emopoiesi fisiologica nel midollo osseo e nella milza, inducendo le cellule mieloidi immature immunosoppressive a sostenere la crescita tumorale, la neo-vascolarizzazione, ed infine l'invasione (Gabrilovich *et al*, 2012). In tal modo, con lo scopo di creare un macroambiente pro-tumorale, le cellule del tumore condizionano anche siti lontani come il midollo osseo e la milza attraverso fattori solubili e vescicole di membrana, come gli esosomi.

E' evidente da oltre un secolo che il cancro è una malattia sistemica, ma la partecipazione del macro-ambiente nello sviluppo e nella progressione tumorale comincia solo ora ad essere apprezzata. Recentemente, molti lavori evidenziano che durante la progressione tumorale c'è una forte attivazione temporale e spaziale dell'emopoiesi e un'evidente risposta immunitaria. Infatti tessuti tumorali solidi e circuiti linfoide correlati (midollo osseo e milza) promuovono l'interazione reciproca con la complessità inaspettata. Ad esempio, nel cancro al seno di tipo luminale (LBC), le cellule stabiliscono un macro-ambiente sistemico che supporta la diffusione di tumori altrimenti indolenti. I LBC secernono citochine che attivano le cellule del midollo osseo (Kuznetsov *et al.*, 2012) e questa cascata di eventi ha come risultato la crescita di adenocarcinomi e viene abolita quando l'attivazione delle cellule del midollo osseo è inibita da

un composto anti-infiammatorio come l'aspirina. Questi risultati evidenziano come il macro-ambiente sia una componente importante per la progressione della malattia (Becker *et al.*, 2014). Non è ancora chiaro come le cellule del midollo osseo con azione pro-oncogenica siano attivate e se ci siano componenti cellulari e molecolari che sono comuni a tutti i tipi di macro-ambienti pro-tumorali o se questi siano specifici per particolari tessuti e/o tipi di tumore. Sarà importante rispondere a queste domande e su quali sono i primi meccanismi di risposta immunitaria che si verificano e qual'è la loro evoluzione durante la fase pre-neoplastiche della carcinogenesi. Così come sarà importante identificare se esiste una “diafonia” nel tumore fra macro-ambiente e tessuto bersaglio prima che inizi il processo e se influenzi lo sviluppo del tumore in senso positivo o negativo. La mancanza di questa conoscenza è dovuta principalmente alla mancanza di modelli umani e animali in cui è possibile seguire l'evoluzione del tumore dai primi passi e per tutto il tempo della crescita. Nel presente progetto si ipotizza che l'acquisizione delle funzioni tumorigeniche sta procedendo tramite iniziative concrete che coinvolgono risposte del macro-ambiente, che non sono state ancora caratterizzate a causa dei limiti degli strumenti sperimentali adottati finora. In questo lavoro di dottorato, utilizzando strumenti di imaging non invasivo per misurare in studi longitudinali la proliferazione in tutta la vita degli animali, abbiamo identificato spazio-temporalmente le prime fasi di trasformazione pre-neoplastica, che coinvolgono attivazione di proliferazione del midollo osseo e della milza dove gli eventi molecolari pro o anti-crescita tumorale potrebbe avvenire.

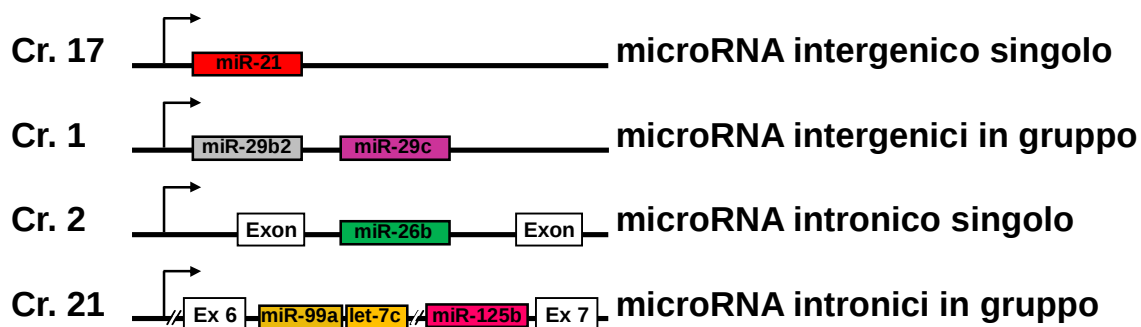
CAPITOLO 4. I microRNA

I microRNA (miRNA) sono piccole molecole di RNA non codificanti di 19-25 nucleotidi (nt) a singolo filamento; regolatori trascrizionali e post-trascrizionali dell'espressione genica (Tan *et al.*, 2009). I miRNA funzionano tramite accoppiamento di basi con sequenze complementari delle molecole di RNA messaggero bersaglio, inducendo la loro degradazione o impedendone la traduzione nel corrispondente prodotto proteico.

Le prime evidenze sull'esistenza dei miRNA risalgono al 1993 da parte di Victor Ambros e colleghi, i quali studiavano i difetti nel controllo temporale dello sviluppo post-embrionale nel nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Mediante uno screening genetico, il gruppo identificò un gene, *lin-4*, che non codificava per una proteina ma per due piccoli RNA, di circa 61 e 22 nt. Lo stesso gruppo di ricerca notò che questi RNA mostravano complementarietà antisense con diversi siti nella regione 3' non tradotta (3'UTR) dell'RNA messaggero (mRNA) del gene *lin-14* (Lee *et al.*, 1993). Grazie a questi siti complementari, con un meccanismo che allora non era ancora noto, *lin-4* riduceva notevolmente i livelli di proteina LIN-14 senza alterare

in modo significativo i livelli del rispettivo mRNA. L'interazione diretta fra i due RNA era dunque responsabile del controllo negativo dell'espressione della proteina LIN-14, la cui repressione traduzionale è essenziale per la normale transizione dal primo al secondo stadio di sviluppo larvale di *C. elegans*. Da allora, l'RNA *lin-4* di 22 nt è stato riconosciuto come capostipite dell'intera classe dei miRNA (Lee & Ambros, 2001; Zhang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006; Meshesha *et al.*, 2012). Dopo la loro scoperta nei nematodi, i miRNA sono stati identificati anche negli eucarioti unicellulari, negli animali, nelle piante e addirittura nei virus, dove esercitano un ruolo fondamentale per la regolazione dell'espressione genica alla base di moltissimi processi cellulari.

Il miRNA "maturo" è la forma funzionalmente attiva che deriva dal processamento di una molecola di RNA precursore più grande, la cui sequenza può essere contenuta all'interno di regioni introniche di altri geni o all'interno di regioni intergeniche, in un *locus* proprio (Stroynowska-Czerwinska *et al.*, 2014). In entrambi i casi, i loci possono essere singoli o essere organizzati in posizioni adiacenti detti *cluster* (figura 6).



Modificato da Kapinas & Delany, 2011

Figura 6. Localizzazione ed organizzazione genomica di alcuni miRNA noti. I geni dei miRNA possono essere intergenici (singoli o in gruppo) o intronici (singoli o in gruppo), nella sequenza di geni codificanti proteine o di geni non codificanti.

Nell'uomo, sono stati fino ad oggi identificati più di duemila miRNA maturi e si stima che almeno il 60% dei geni umani sia regolato mediante interferenza di RNA indotta dai miRNA (Croce *et al.*, 2009)

I miRNA sono trascritti nel nucleo ad opera della RNA polimerasi II o, meno frequentemente, della RNA polimerasi III (Borchert *et al.*, 2006), producendo un trascritto chiamato pri-miRNA. I pri-miRNA possono essere lunghi da qualche centinaia fino ad alcune migliaia di basi e possono contenere uno o più precursori dei miRNA (pre-miRNA) in forma policistronica. L'evento di maturazione successivo che produrrà il pre-miRNA a partire dal pri-miRNA avviene ad opera di un complesso multi-proteico chiamato *Microprocessor* (figura 7), i cui componenti

principali sono l'RNA endonucleasi di tipo III, Drosha e la proteina di legame all'RNA a doppio filamento DGCR8 (*DiGeorge Critical Region 8*) (Stroynoska *et al.*, 2014).

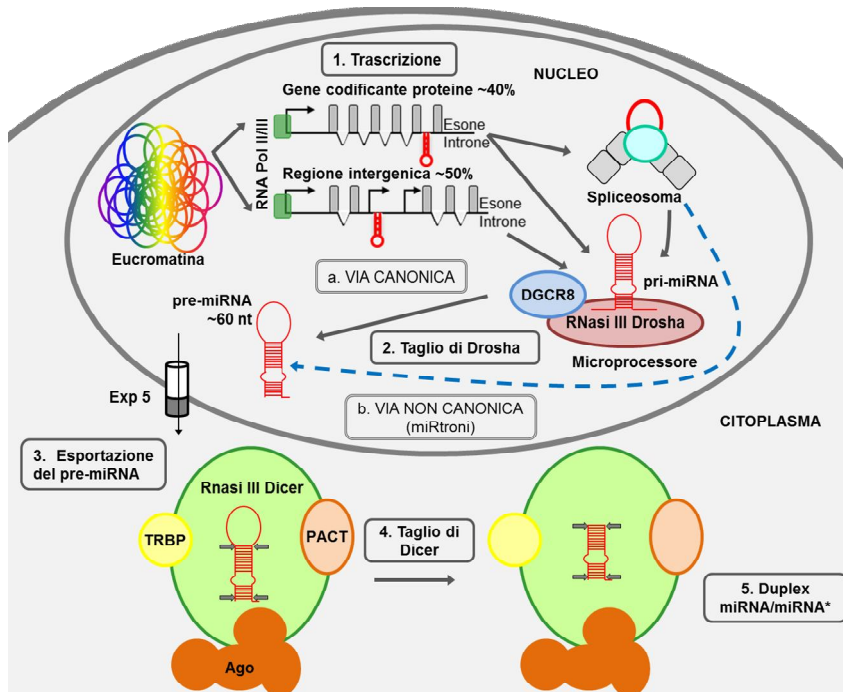


Figura 7. Meccanismo di biogenesi dei microRNA nelle cellule umane. La via classica (a) segue tutte le fasi dal 1 a 5 in figura; la via non canonica Drosha-indipendente (b) è indicata dalla freccia arancione tratteggiata. (Modificata da Stroynowska-Czerwinska *et al.* 2014).

Il pre-miRNA consiste in una struttura a forcina imperfetta della lunghezza di 60-70 nt, caratterizzato da una peculiare estremità protrudente di due nucleotidi a singolo filamento alle terminazioni 3' (Lee *et al.*, 2003). La proteina RAN-GTPasi Esportina-5 (Exp5) riconosce e lega queste estremità, mediando la traslocazione attiva del pre-miRNA dal nucleo verso il citoplasma (Lund *et al.*, 2004; Zeng & Cullen, 2006) (figura 7).

Il pre-miRNA una volta traslocato nel citoplasma viene riconosciuto a livello della protrusione al 3' da un altro complesso multienzimatico formato dall'RNA endonucleasi di tipo III, Dicer, dalle proteine Ago2 e TRBP (*Transactivation-Response RNA-Binding Protein*). Questo complesso multienzimatico determina il processamento del pre-miRNA, tagliandolo nella forma finale di piccolo RNA a doppio filamento di 22 nt circa. Questo piccolo RNA, chiamato duplex miRNA è costituito dal filamento del miRNA maturo (filamento "guida") e dal suo complementare (filamento "passeggero") (Meister & Tuschl, 2004).

Il filamento maturo viene incorporato nel complesso ribonucleoproteico dei miRNA (miRNP), noto anche come complesso di silenziamento indotto da RNA miRISC (*miRNA Induced*

Silencing Complex). A questo punto il complesso miRISC-microRNA maturo è in grado di svolgere la sua azione di regolatore negativo sugli RNA messaggeri bersaglio (figura 8).

Modificata da Stroynowska-Czerwinska et al. 2014

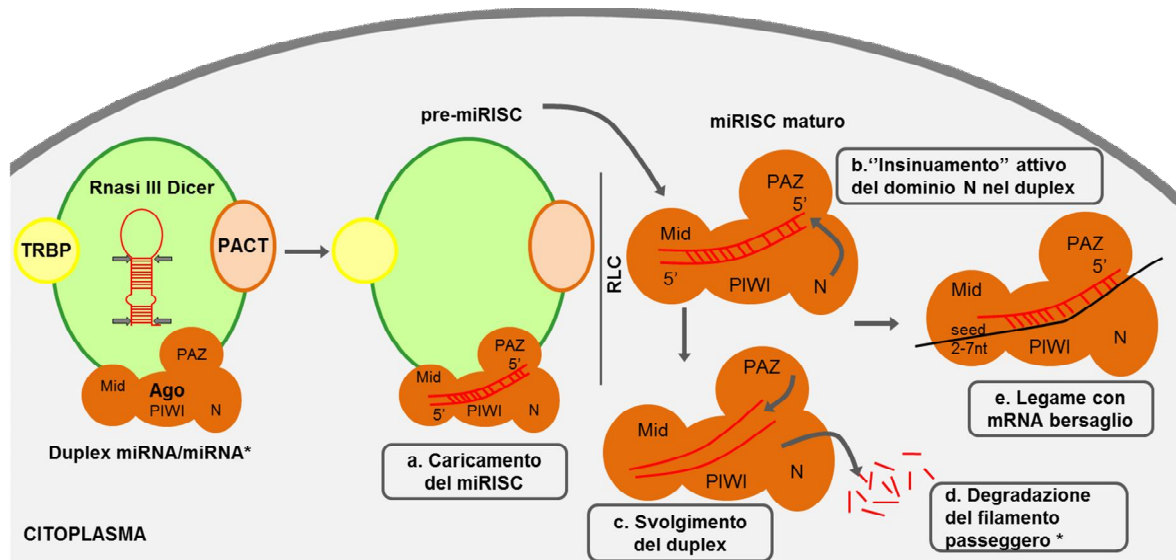


Figura 8. Assemblaggio del miRISC nelle cellule umane. Il primo passaggio (a) è il caricamento del miRISC che coincide con il trasferimento del duplex miRNA da Dicer ad Ago; il dominio N terminale di Ago si “infila” tra i due filamenti del duplex (b); il dominio PAZ di Ago scioglie il duplex (c); il filamento passeggero del duplex viene allontanato dal miRISC e rapidamente degradato (d); il miRNA rimasto all’interno del miRISC è il miRNA maturo, ovvero quello in grado di regolare l’espressione dei suoi mRNA bersaglio (e).

Il controllo negativo dell’espressione genica da parte del complesso miRISC-microRNA maturo avviene a livello post-trascrizionale secondo due modalità di azione: la degradazione dell’mRNA bersaglio o l’inibizione della sua traduzione. La scelta dell’uno o dell’altro meccanismo di silenziamento genico dipende dal grado di complementarità dell’appaiamento tra la regione dei primi 6-8 nt al 5’ del microRNA, detta “sequenza seme” (seed sequence), e la regione 3’UTR del messaggero bersaglio: l’appaiamento imperfetto, dovuto ad una ridotta omologia di sequenza tra i due RNA, porta generalmente alla sola repressione traduzionale dell’mRNA bersaglio senza degradazione, mentre l’appaiamento perfetto, che si osserva quasi esclusivamente nei microRNA delle piante, stimola il taglio del messaggero dal parte del complesso miRISC con conseguente degradazione dell’mRNA bersaglio (Ambros, 2004).

4.1 MICRORNA COME POSSIBILI BIOMARCATORI TUMORALI

I microRNA, sin dalla loro scoperta, risultano essere la famiglia di molecole biologiche su cui maggiormente si è focalizzata l’attenzione dei ricercatori. Una recente ricerca, infatti, dimostra che su PubMed i miRNA sono citati da più di 34.000 articoli scientifici. Alla base di questo

grande interesse ci sono le numerose evidenze sperimentali che dimostrano che questi piccoli RNA non codificanti subiscono una globale alterazione del loro “*pattern*” di espressione in molteplici patologie umane, compreso il cancro (Croce *et al.*, 2009; Nana-Sinkam *et al.*, 2013). Infatti, è stato dimostrato che attraverso la loro capacità di inibire l’espressione di decine/centinaia di geni, i miRNA possono regolare le funzioni biologiche basilari e i “*pathways*” essenziali per lo sviluppo e la progressione tumorale (Croce *et al.*, 2009). Questo, in aggiunta al fatto che sono molecole molto conservate tra le specie, rende i miRNA dei candidati ideali da impiegare nella terapia dei tumori. Infatti, i miRNA regolano più di un terzo dell’intero genoma umano e considerando il complesso “*landscape*” della biologia dei tumori, la fondamentale importanza dell’impiego di questi RNA non codificanti nella stratificazione della patologia ed, eventualmente, nella terapia risulta ancora più chiaro. Inoltre, la globale alterazione dell’espressione dei miRNA alla base dell’insorgenza della trasformazione neoplastica mette in luce anche la possibilità di utilizzare i miRNA come biomarcatori di ultima generazione nella diagnosi precoce dei tumori. Sebbene la ricerca di biomarcatori tissutali sia utile ai fini della diagnosi della malattia, tuttavia, la ricerca di biomarcatori non-invasivi da utilizzare per la diagnosi precoce del cancro attrae sempre più l’interesse dei ricercatori, poiché non sempre è possibile ottenere una biopsia tumorale. A questo scopo si stanno attuando nuove tecnologie per la ricerca di specifici fattori circolanti fra cui i miRNA (Mitchell *et al.*, 2008). La deregolazione dei miRNA circolanti è stata descritta in molteplici tipi di cancro, compreso quello al seno (Schooneveld *et al.*, 2012).

4.1.1 Deregolata espressione di miRNA oncogeni ed oncosoppressori nel carcinoma mammario

Studi di profili di espressione hanno evidenziato un’espressione aberrante di diversi miRNA nel carcinoma mammario (Christodoulatos *et al.*, 2014). Inoltre, questa espressione deregolata di alcuni miRNA è stata associata alla classificazione del tumore, lo stadio e la prognosi. Come in altri tipi di tumore, alla base della connessione tra l’espressione aberrante di alcuni miRNA alterati e lo sviluppo del tumore al seno così come la formazione di metastasi si colloca la ridotta espressione di miRNA oncosoppressori, come la famiglia let-7, miR-7, -30a, -31, -34a, -125, -200, -203, -205, -206, -342 o l’iperespressione di miRNA oncogenici, comunemente denominati oncomiRNA, come miR-10b, -21, -135 bis, -155, -221, -222, -224, -373, e miR-520c (O’Day *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2012). Analogamente il processo di metastatizzazione può essere facilitato da una maggiore espressione di miRNA pro-metastatici (miR-224, -135, -375, -182, -183) e/o

essere inibito dalla ridotta espressione di quei miRNA che svolgono un'azione antimetastatica (miR-203, -30a, -335, -126, -125) (O'Day *et al.*, 2010; Christodoulatos *et al.*, 2014).

La figura 9 mostra i miRNA più importanti in qualità di oncogeni o oncosoppressori tumorali nel carcinoma mammario. Per esempio, in biopsie di tumore al seno si osserva un'aumentata espressione di miR-21 associata ad uno stadio clinico avanzato con linfonodi positivi e correlata a prognosi infausta (Christodoulatos *et al.*, 2014). Un altro esempio di un miRNA potenzialmente associato alla progressione del tumore al seno è il miR-155. Infatti, la sua iperespressione correla con un grado avanzato di malattia caratterizzato dalla mancata espressione dei recettori per gli estrogeni, invasione dei linfonodi, metastasi e prognosi infausta (Christodoulatos *et al.*, 2014).

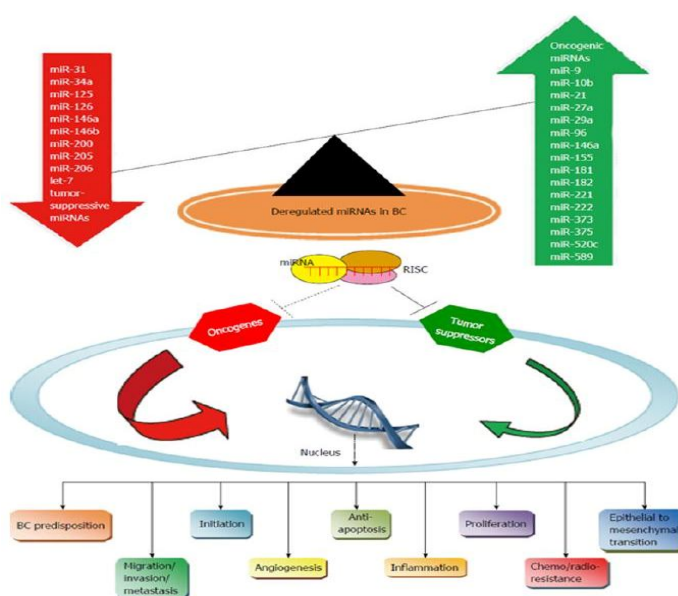


Figura 9. Deregolazione dei miRNA nella patogenesi del cancro al seno. I miRNA oncosoppressori che inibiscono l'espressione di putativi oncogeni, sono ipoespressi nel cancro al seno (freccia rossa). I miRNA oncogenici che inibiscono l'espressione di putativi oncosoppressori, sono iperespressi nel cancro al seno (freccia verde). Entrambi i meccanismi portano ad espressione genica aberrante che svolge un ruolo significativo nella patogenesi del cancro al seno.

Per quanto riguarda i miRNA oncosoppressori, diversi studi evidenziano una minore espressione di alcuni miRNA fra cui miR-30a, 31, 34a, 126, la famiglia dei miR-200, 205 ed il cluster let-7c, miR-99a e 125b nel cancro al seno (Christodoulatos *et al.*, 2014).

4.1.2 La famiglia dei miRNA let-7 La famiglia di miRNA let-7, spesso presente in copie multiple nel genoma, è molto conservata nelle specie animali (Lee *et al.*, 1993; O'Day *et al.*, 2010). Le diverse isoforme della famiglia (distinte grazie ad una lettera dopo il termine comune

“let-7”) differiscono leggermente tra loro nella sequenza del miRNA maturo; un numero posto alla fine del nome può indicare che la stessa sequenza è presente in copie multiple nel genoma. Mentre nel topo esistono 14 membri differenti della famiglia let-7, nell’uomo esistono dieci sequenze mature di let-7 e tredici loci genici (Peter *et al.*, 2009; Boyerinas *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2011). La ridotta espressione di vari membri della famiglia let-7 è stata associata a molti tumori umani (Büssing *et al.*, 2008) ed alle cellule staminali tumorali (Yu *et al.*, 2007), suggerendo un ruolo di questi microRNA come oncosoppressori nei tumori umani. In particolare, l’espressione dei microRNA let-7 è stata trovata ridotta in linee cellulari e tessuti primari di carcinoma polmonare a cellule non piccole (Takamizawa *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2007) e in pazienti affetti da carcinoma polmonare, è associata a cattiva prognosi (Takamizawa *et al.*, 2004). Questi dati sono in accordo con l’osservazione che diversi membri della famiglia let-7 mappano su siti cromosomici frequentemente deleti nei tumori polmonari (Calin *et al.*, 2004). Potenziali meccanismi molecolari di una funzione oncosoppressoria dei microRNA let-7 emergono da diversi studi, nei quali è stato riportato che let-7 regola numerosi oncogeni. Ad esempio, è stato dimostrato che K-RAS e N-RAS sono bersagli molecolari di let-7, suggerendo che questi microRNA possano funzionare da oncosoppressori nei carcinomi polmonari *in vivo* riducendo l’espressione di RAS (Johnson *et al.*, 2005). Un altro bersaglio molecolare di let-7 è l’oncogene MYC (myelocytomatosis), sebbene la rilevanza *in vivo* di questa interazione debba essere ancora completamente chiarita (Leucci *et al.*, 2008). Il *cluster* altamente conservato del let-7a, let-7d e let-7f può essere coinvolto nei linfomi a cellule B, poiché sembra essere regolato direttamente dall’oncogene *v-myc* (**myelocytomatosis oncogene viral homologue**). È stato dimostrato che let-7a reprime l’espressione di MYC nel linfoma di Burkitt, suggerendo l’esistenza di un circuito a “*feedback*” negativo (Sampson *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2008). Altri bersagli diretti dei miRNA let-7, che supportano la potenziale rilevanza di questa famiglia di miRNA nel controllo del ciclo cellulare in cellule tumorali, sono la fosfatasi CDC25a, la chinasi ciclina-dipendente CDK6 e la ciclina D1, regolatori fondamentali della progressione del ciclo cellulare (Johnson *et al.*, 2007; Schultz *et al.*, 2008). Nonostante la ridotta espressione dei membri della famiglia let-7 sia stata generalmente associata ad un aumento della capacità trasformante, alcuni dati contrastanti, derivati da studi effettuati su diversi tipi di cancro, suggeriscono che la funzione della famiglia let-7 non sia ancora completamente chiarita e che i singoli membri della famiglia let-7 possano avere ruoli distinti. È possibile, infatti, che i 13 loci genici di let-7 nell’uomo svolgano diverse funzioni nei vari tessuti, ma potrebbero avere differenti funzioni anche all’interno della stessa cellula. Alcuni lavori riportano che in diversi tumori alcune isoforme di let-7 sono iper-esprese mentre altre sono delete (Guled *et al.*, 2009).

Comunque, numerosi studi hanno dimostrato che let-7 è spesso assente nelle cellule meno differenziate caratterizzate da un fenotipo mesenchimale e rappresentative di uno stadio tumorale più avanzato (Shell *et al.*, 2007). In accordo con questo, cellule maggiormente differenziate presentano livelli d'espressione di let-7 più elevati e mostrano un fenotipo epiteliale ed uno stadio tumorale meno avanzato. Studi *in vivo* hanno dimostrato che la somministrazione di let-7 è efficace contro i tumori del polmone e della mammella (Trang *et al.*, 2011). Inoltre, analisi computazionali suggeriscono che let-7 potrebbe essere anche efficace nella terapia dei carcinomi metastatici mammari ER-positivi (Barh *et al.*, 2010).

Studi di espressione di let-7 in cellule di carcinoma mammario hanno dimostrato che let-7-f1 è espresso in più linee di cellule tumorali (Jiang *et al.*, 2005). Ulteriori ricerche hanno dimostrato il ruolo di let-7 nel differenziamento delle “Breast Tumor-Initiating Cell” (BT-IC). In particolare, è stato dimostrato una ridotta espressione di let-7 in BT-IC, mentre l'aumento dei suoi livelli di espressione correla con il differenziamento (Yu *et al.*, 2007). La somministrazione di let-7 in BT-IC, inoltre, determina *in vivo*, una riduzione della proliferazione cellulare e della capacità di invasione. Questi dati suggeriscono che let-7 influenzi la capacità di auto-rinnovamento delle cellule tumorali, quindi una terapia tumorale, in pazienti con cancro al seno, attraverso “targeting” di let-7 potrebbe essere potenzialmente utile e/o servire come nuovo trattamento. Alcuni autori hanno proposto un ruolo per let-7 anche nel processo metastatico del tumore mammario (Dangi-Garimella *et al.*, 2009). Questo studio ha dimostrato le varie vie di segnalazione attraverso cui let-7 regola l'azione repressiva della RKIP (Raf proteina chinasi inibitoria) durante il processo di metastatizzazione di cellule tumorali mammarie (Dangi-Garimella *et al.*, 2009). RKIP è un gene con capacità oncosoppressive ed è stato dimostrato che è in grado di inibire MAPK (G protein-coupled receptor kinase-2) e la cascata di segnale NF-κB (“nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”) nei tumori mammari (Hagan *et al.*, 2005; Baselga *et al.*, 2009). Pertanto, questi dati ci suggeriscono una possibile riduzione d'espressione di let-7 in linee cellulari invasive. In accordo con ciò, in modelli murini di carcinoma mammario, RKIP inibisce l'invasione metastatica e reprime la capacità cellulare di colonizzare nuovi tessuti. Inoltre, l'inibizione di MAPK comporta una riduzione della trascrizione di LIN28, con conseguente downregolazione dei “target” di let-7. I bersagli di let-7 sono meccanicisticamente legati alla metastatizzazione dei carcinomi, e quindi la loro downregolazione migliora il processo attraverso il quale RKIP esercita la sua capacità oncosoppressoria (Zhao *et al.*, 2011). La famiglia dei miRNA let-7 è anche regolata negativamente in cellule tumorali mammarie allo stadio di carcinoma duttale *in situ* (DCIS) e di carcinoma duttale invasivo (IDC). Un'iperespressione dei membri della famiglia let-7 in cellule

ER-positive determina una ridotta attività ER- α , una ridotta proliferazione cellulare e induzione dei fenomeni apoptotici.

Da quanto sopra detto i membri di questa famiglia di miRNA potrebbero svolgere un importante ruolo terapeutico nella patogenesi del cancro. Tuttavia, il meccanismo di de-regolazione di let-7 ed il suo ruolo nella tumorigenesi non è stato ancora completamente chiarito. Ulteriori studi sui meccanismi molecolari responsabili dell'attività di let-7 nei tumori, ed in particolare nel tumore mammario, potrebbero rendere questi miR dei candidati ideali per nuove applicazioni terapeutiche.

4.1.3 Il cluster let-7c-99a 125b

Il cluster oggetto del presente studio è situato nel sesto introne del gene non-codificante proteine *LINC00478* che mappa sul cromosoma 21 (figura 10). Let-7c e miR-99a sono localizzati a circa 650 bp uno dall'altro mentre miR-125b-2 è circa 50 kb a valle. Sebbene la distanza (50 kb) è maggiore della distanza standard per un cluster, l'analisi di vari genomi mostra che questa regione è molto conservata nella sua organizzazione e pertanto è da considerarsi un *cluster* (figura 10).

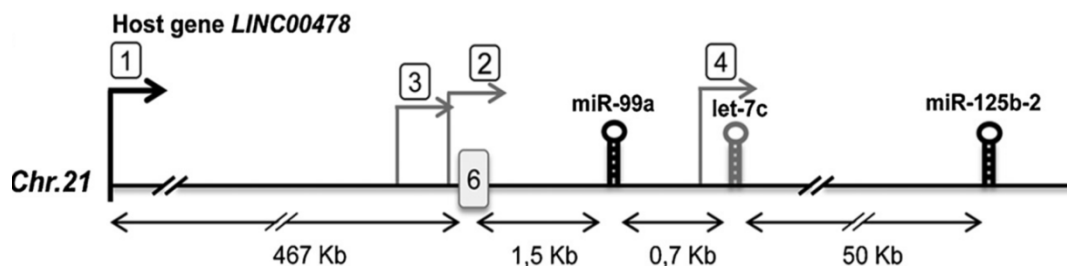


Figura 10: **Organizzazione del cluster di let-7c e putativi TSS.** Il cluster miR-99a -let-7c-miR125b-2 è localizzato nel gene ospite *LINC00478* situato sul cromosoma 21. [1] indica il TSS del gene ospite. [2], [3] e [4] indicano le posizioni dei putativi TSS descritte rispettivamente da Ozsolak *et al.* (2008), Corcoran *et al.* (2009) e Monteys *et al.* (2010).

Recentemente è stato descritto che l'espressione dei membri del cluster let-7c, miR-99a e miR-125b diminuisce durante la progressione del carcinoma mammario ER-negativo. In dati derivati da un'ampia coorte di tumori mammari primari, l'espressione di questi miRNA diminuisce in maniera uniforme nei tumori di tipo luminal B. In maniera significativa questo non avviene nei tumori ER-positivi, caratterizzati da una prognosi favorevole, cioè il sottotipo tumorale luminal A. Questi dati suggeriscono che l'andamento della malattia potrebbe essere direttamente collegato all'espressione di proteine bersaglio di questi miRNA. Infatti, sia let-7c che miR125

regolano l'espressione di HER2. In accordo con questo, utilizzando i dati derivati dal data set "Breast Invasive Carcinoma" nel "The Cancer Genome Atlas" (TCGA) è stato possibile dimostrare che esiste una significativa correlazione negativa tra l'espressione di let-7c e l'espressione della proteina HER2 (Bailey *et al.*, 2014).

4.1.4 miR 99a

Il miRNA 99a viene considerato un miRNA oncosoppressore data la sua ridotta espressione in molteplici tipi di tumore. Per quanto riguarda il tumore mammario, esperimenti in vivo hanno dimostrato il suo coinvolgimento nell'inibizione della transizione epitelio mesenchima (EMT), mediata dal TGF- β , durante lo sviluppo della ghiandola mammaria (Turcatel *et al.*, 2012). Inoltre, lo studio condotto da Hu e colleghi (2014) ha sottolineato il ruolo anti-oncogenico del miR-99a nel tumore al seno. In particolare, i loro esperimenti sono stati condotti su biopsie mammarie derivate da pazienti. I loro risultati hanno dimostrato che il livello di espressione del miR-99a risulta significativamente ridotto rispetto ai controlli (tessuti mammari sani). È stato evidenziato che la chinasi mTOR ("mammalian target of rapamycin") costituisce il diretto bersaglio molecolare del miR-99a, e l'espressione dei fattori a valle di mTOR viene significativamente ridotta in seguito ad un'aumentata espressione di questo miR. Questa chinasi è coinvolta in molteplici processi cellulari come la proliferazione, la motilità e la sopravvivenza delle cellule, ma anche nella sintesi proteica e la trascrizione. Da ciò, emerge dunque, che il miR-99a potrebbe essere utilizzato come potenziale agente terapeutico nella cura del tumore al seno (Hu *et al.*, 2014).

4.1.5 miR-125a e miR-125b

L'alterata espressione del miR-125 è stata osservata in diversi tumori, tra cui il cancro al seno (Shi *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009). Nell'uomo il miR-125 presenta due isoforme: miR-125a e -125b. Entrambe queste isoforme sono ipoespresse in pazienti affetti da carcinoma mammario. Il miR-125b, riconoscendo una sequenza specifica nel 3' UTR, inibisce l'espressione sia di HER2 che di HER3 (Mattie *et al.*, 2006; Scott *et al.*, 2007). Questo doppio bersaglio riflette appieno il suo ruolo oncosoppressivo in molteplici tipi di tumori HER2 dipendenti, compreso il carcinoma mammario. Nelle forme invasive di carcinoma mammario, di cancro ovarico, di tumore alla tiroide e di epatocarcinoma miR-125b risulta significativamente ipoespresso e ciò spesso correla con una prognosi infausta e con la comparsa di linfonodi e metastasi (Visone R *et al.*, 2007; Li W *et al.*, 2008; Nam *et al.*, 2008). Per quanto riguarda il miR-125a è stato dimostrato che in linee cellulari di carcinoma mammario l'espressione di questo miRNA è inversamente correlata

all'espressione di HuR ("human antigen R"), una proteina legante RNA (RBP) generalmente iperespressa nei tumori. Il miR-125a reprime la traduzione di HuR attraverso il legame con il suo 3'UTR. L'espressione ectopica del miR-125a determina ridotti livelli della proteina HuR, reprimendo la sua traduzione attraverso il legame con il suo 3'UTR, con conseguente inibizione della proliferazione e migrazione cellulare. Questi risultati suggeriscono che il miR-125a potrebbe funzionare nel carcinoma mammario come oncosoppressore utilizzando come diretto e funzionale bersaglio HuR (Guo *et al.*, 2009).

OBIETTIVI DEL LAVORO

Nel laboratorio presso cui è stata svolta questa ricerca è stato ingegnerizzato un modello murino (MITO-Luc), in cui è possibile visualizzare eventi di proliferazione attraverso la tecnica non invasiva del Bio-Luminescence-Imaging (BLI). Poichè una proliferazione deregolata ed aberrante è alla base dello sviluppo della maggior parte dei tumori, il principale obbiettivo di questo lavoro è stato quello di identificare stadi precoci dello sviluppo tumorale. Per raggiungere questo scopo abbiamo utilizzato il modello murino MITO-Luc incrociato con un modello geneticamente modificato che sviluppa tumore alla mammella; MMTV-NeuT (Boggio *et al.*, 1998). Grazie all'impiego di questo modello è stato infatti possibile visualizzare l'evoluzione temporale del tumore mammario nell'ambito dell'intero animale sin dagli stadi precoci della malattia. Sorprendentemente, dal monitoraggio degli animali effettuato dalla 7^a fino alla 18^a settimana di vita non è stato possibile mettere in evidenza un aumento di luminescenza/proliferazione a livello delle mammelle nemmeno alle settimane in cui il tumore era palpabile. Al contrario, però, i dati da noi derivati in seguito alle sedute di "imaging" indicano che durante la progressione tumorale, dalla 7^a alla 18^a settimana di vita, è possibile evidenziare in precisi momenti temporali un aumento di luminescenza/proliferazione sistemica in particolare in corrispondenza dei femori e della milza dell'animale. Questo aumento di luminescenza/proliferazione sistemica è dovuto alle cellule della linea mieloide.

Un secondo obiettivo è stato quello di caratterizzare alterazioni geniche associate con gli stadi precoci della progressione tumorale mammaria al fine di capire se una o più di queste alterazioni possano essere utili come biomarcatori precoci di malattia. Pertanto, nel nostro studio abbiamo valutato nel tessuto mammario trasformato e non, i livelli di espressione di specifici miRNA oncosoppressori, in corrispondenza dei momenti della vita dell'animale in cui si osservava un incremento dell'indice di proliferazione sistemica.

MATERIALI E METODI

Condizioni di stabulazione degli animali

Tutti gli esperimenti *in vivo* eseguiti in questo lavoro di tesi sono stati condotti presso lo Stabilimento Allevatore Fornitore Utilizzatore (SAFU) dell'Istituto Regina Elena di Roma. Per ottenere un ambiente che rispetti le necessità fisiologiche degli animali sono stati osservati i seguenti parametri

- Temperatura $20^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$
- Umidità relativa $55\% \pm 10\%$
- Illuminazione cicli luce/buio 10/14
- Ventilazione 8-10 ricambi d'aria/ora

La stabulazione di animali è avvenuta in gabbie, rispettando i parametri relativi al rapporto superficie della gabbia/peso dell'animale. I topi sono stati alloggiati all'interno di gabbie di materiale plastico con lettiera costituita da segatura con requisiti di legge e con potere assorbente per urina e deiezioni. Gli animali sono stati tenuti, in relazione a quanto prescritto per legge, in numero non superiore a sei per gabbie di dimensioni di 370 cm^2 e alte 12 cm. Gli animali hanno avuto libero accesso all'acqua e sono stati alimentati con una dieta a base di pellett "*ad libitum*".

Accoppiamento degli animali

Sono stati effettuati incroci utilizzando topi MITO-Luc del ceppo FVB, eterozigoti per l'allele MITO e topi MMTV-NeuT del ceppo FVB eterozigoti per l'allele NeuT. La progenie eterozigote della generazione F1 è stata ulteriormente reincrociata per ottenere, alla generazione successiva F2, sia topi MITO/NeuT negativi che MITO/NeuT positivi. Un maschio è stato accoppiato con due femmine. In questo modo, si sfruttano al massimo gli estri "*postpartum*", ottenendo un elevato numero di nidiate.

Genotipizzazione degli animali

La genotipizzazione degli animali è stata effettuata mediante PCR sul DNA genomico proveniente dalle code. In breve, sono state prelevate biopsie caudali ed incubate "*over night*" a 53° con $28,6\mu\text{l}$ di proteinasi K concentrata 20mg/ml e $500\mu\text{l}$ di Tail Solution composta da TRIS HCl 50mM pH 8, EDTA 100mM , NaCl 100mM ed SDS all'1%. Per l'estrazione del DNA genomico è stato aggiunto Fenolo Cloroformio ($500\mu\text{l}$), e centrifugato per 10 minuti a temperatura ambiente alla velocità di 13.000 rpm . Il surnatante è stato trasferito all'interno di tubi puliti. La precipitazione di DNA è stata eseguita aggiungendo $50\mu\text{l}$ di sodio acetato ($\text{C}_3\text{H}_2\text{NaO}_2$) 3M a pH 5,6 e $350\mu\text{l}$ di isopropanolo. I campioni sono stati poi centrifugati a 4°C alla velocità di 13.000 rpm per 45 minuti. Una volta aspirato il surnatante è stato eseguito il lavaggio in $500\mu\text{l}$ di etanolo ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) al 70% e la centrifugazione a 4°C per 30 minuti. Il surnatante è stato

nuovamente eliminato mediante aspirazione e il pellett di DNA formatosi è stato lasciato ad asciugare a temperatura ambiente per poi essere risospeso in 300µl di H₂O MilliQ autoclavata. Il DNA così ottenuto è stato utilizzato per la genotipizzazione, effettuata mediante PCR classica, servendoci degli oligonucleotidi specifici per il trans-gene MITO:

- FW: GGCGTCTTCCATTTTACCAACAGTACCGG
- RW TGTAGACAAGGAAACAACAAAGCCTGGTGGCC;

e per il trans-gene Neu:

- FW: ATCGGTGATGTGCGCGATAT
- RW: GTAACACAGGCAGATGTAGG

Imaging BioLuminescente (BLI)-in vivo ed ex vivo

Principio della tecnica L'“imaging” con bioluminescenza è un sistema reporter basato su una reazione enzimatica catalizzata dalla proteina luciferasi, enzima che genera luce nel campo del visibile ossidando il proprio substrato, la D-luciferina, ad ossiluciferina, in sistemi viventi (Sadikot *et al.*, 2008). In natura esistono vari sistemi bioluminescenti ognuno caratterizzato da uno specifico sistema enzimatico. Il sistema bioluminescente più usato in ricerca scientifica è la luciferasi della lucciola del Nord America (*Photinus pyralis*; FLuc), ma sono state identificati diversi cloni di luciferasi dalle meduse (*Aequorea*), dalla sea pansy (*Renilla*), dai coralli (*Tenilla*), dall'elaterio (*Pyrophorus plagiophthalmus*) e da vari batteri come *Vibrio fischeri* e *V. harveyi*. La luciferasi è una proteina marcatore eccellente per l'espressione genica perché manca di modificazioni posttraduzionali ed ha un tempo di dimezzamento ($t_{1/2}$) *in vivo* di circa 3 ore. La luce emessa dalla reazione luciferasi/luciferina è ad ampio spettro (530-640nm) con il picco di emissione a 562nm. Questo spettro di emissione, accoppiato alla proprietà ottiche dei tessuti, permette alla luce di penetrare attraverso diversi centimetri di tessuto. È così possibile rilevare luce emessa da organi interni di piccoli mammiferi che esprimono la luciferasi come gene reporter. I fotoni vengono rilevati da speciali camere CCD (“charge coupled device”) che convertono i fotoni in elettroni. La CCD camera codifica spazialmente l'intensità dei fotoni incidenti in pattern di carica elettrica per generare un'immagine. Queste camere sono comandate da un computer per l'acquisizione dell'immagine e per l'analisi. La reazione catalizzata dalla luciferasi è una complessa interazione tra ATP, ossigeno e luciferina (substrato esogeno). Poiché è necessaria la presenza dell'ATP, la reazione avviene solo nelle cellule metabolicamente attive, che contengono la luciferasi. L'intensità del segnale luminoso dipende da vari fattori, come il livello di espressione della luciferasi, la concentrazione del substrato, la lunghezza d'onda della luce generata, la sensibilità del sistema di rilevazione e la localizzazione delle cellule marcate

all'interno dell'organismo. In generale l'intensità del segnale decresce di circa 10 volte per ogni centimetro di tessuto attraversato.

Procedura sperimentale La procedura consiste nella sedazione (somministrazione via intramuscolo con una miscela di Zoletil/Xilor alla concentrazione di 2mg/kg) del topo e la somministrazione per via intraperitoneale di D-luciferina (75mg/kg). La sedazione dell'animale è richiesta al solo fine di poter effettuare l'analisi limitando la motilità del topo per il tempo strettamente necessario all'acquisizione dell'immagine (a seconda dell'intensità del segnale da 1 a 5 minuti per analisi). Il sale sodico di D-luciferina non è tossico nè irritante e viene risospeso in PBS. Il topo viene quindi posto nella camera termostata a 37°C dello strumento di "Imaging" dove viene lasciato per il tempo strettamente necessario all'analisi. L'animale è quindi riposto nella gabbia e controllato a vista fino a quando non si risveglia dall'anestesia. La procedura è minimamente invasiva. Al termine della procedura sperimentale solo alcuni animali verranno sacrificati e gli organi prelevati per la successiva analisi istologica. La procedura sperimentale seguita per effettuare l'imaging *ex vivo*, consiste nel trasferimento dell'organo appena prelevato all'interno di una Dish da 10cm. Quest'ultima viene riempita con D-luciferina e PBS e inserita all'interno della macchina, dove viene sottoposta ad una seduta di "imaging" di 5 minuti. Tutte le tecniche di imaging *in vivo* ed *ex vivo* presentate in questo lavoro sono state effettuate grazie all'utilizzo del sistema IVIS Lumina II CCD camera in dotazione presso il SAFU. I dati sono stati analizzati grazie al software Living Image 2.20 (Caliper Life Sciences).

Iniezione intraperitoneale L'animale durante l'iniezione, effettuata tramite l'inserimento dell'ago nell'addome, parallelamente alla linea della zampa e lateralmente alla linea mediana, è tenuto con la testa rivolta verso il basso in modo da permettere l'allontanamento delle anse intestinali dal punto di iniezione, precludendo la possibilità di iniezioni nel tratto gastrointestinale. L'ago, introdotto per 2-3mm di profondità, deve avere una inclinazione di 45° rispetto alla cute. Tale inclinazione permette di perforare lo strato cutaneo e lo strato muscolare in punti non contigui tra loro, precludendo fuoriuscite di materiale al momento dell'estrazione dell'ago.

Prelievo di sangue e preparazione di siero

Per il prelievo di sangue gli animali sono stati anestetizzati con somministrazione intramuscolare di una miscela di Zoletil/Xilor 2 mg/kg. Il sangue è stato prelevato in sede retro-orbitale in quantità conforme alle linee guida e dopo un'ora dal prelievo, il sangue è stato centrifugato a temperatura ambiente per 5' alla velocità di 5000rpm. Il surnatante è stato nuovamente centrifugato per 6' alle stesse condizioni al fine di rimuovere eventuali residui. Il siero così ottenuto è stato suddiviso in aliquote e immediatamente congelate in azoto liquido e conservate a -80 °C.

Autopsie

Quando necessario, gli animali sono stati sacrificati mediante dislocazione cervicale. Dopo il sacrificio, gli organi sono stati prelevati e congelati rapidamente in azoto liquido e conservati a -80 °C.

Preparazione del pellet cellulare da midollo osseo

Per isolare il midollo osseo, i femori sono stati raccolti dopo autopsia. Dopo aver eliminato la pelle e i muscoli, le ossa sono state tagliate perpendicolarmente alla loro lunghezza in corrispondenza delle estremità fino alla comparsa del midollo osseo identificabile perché rosso. Utilizzando una siringa con un ago del diametro di 0,50 x 16mm, 1ml di terreno per culture cellulari (DMEM completo) è stato fatto percolare attraverso tutta la lunghezza dell'osso. Il liquido fuoriuscito è stato raccolto in terreno DMEM completo e mantenuto in ghiaccio. Il midollo osseo così raccolto è stato centrifugato per 5' a 1100rpm. Previa aspirazione del surnatante, il pellet è stato messo in ghiaccio, aggiunto 1ml di NH_4CL -Tris a pH 7,4 ed incubato in ghiaccio per 5'. Sono stati aggiunti 5ml di PBS ed è stato centrifugato per 5' a 1100rpm. Una volta aspirato il PBS, il pellet è stato congelato rapidamente in azoto liquido ed è stato poi conservato a -80 °C.

Gli esperimenti *in vivo* eseguiti in questo lavoro di tesi sono stati condotti in conformità della legge Italiana DL 116/92 e in accordo con i principi delle “Guidelines for Care and Use of Experimental Animals”.

Prelievi e separazione cellulare

Splenectomie. Durante anestesia, la cavità addominale dei topi è stata aperta ed i vasi splenici sono stati cauterizzati. La milza è stata quindi rimossa e immersa in una soluzione di PBS freddo. E' stata preparata una singola sospensione cellulare, passata attraverso un filtro di 70 μM e dopo successive centrifugate e raccolte del surnatante è stata posta la sospensione cellulare con la soluzione di lisi FCM a temperatura ambiente (Santa Cruz Biotechnology).

Midollo osseo. Le tibie ed i femori di topi sono state rimosse utilizzando tecniche sterili ed il midollo osseo è stato fatto percolare attraverso tutta la lunghezza dell'osso. I globuli rossi sono stati lisati con una soluzione di cloruro di ammonio.

Sangue periferico Durante l'anestesia è stato effettuato il prelievo di sangue in sede retro-orbitale in quantità conforme alle linee guida e raccolto in una provetta eparinizzata. Poi è stato posto in soluzione (Santa Cruz Biotechnology) per la lisi delle cellule del sangue prima della colorazione con anticorpi.

Analisi citofluorimetrica.

Durante il saggio di proliferazione *in vivo* i topi sono stati iniettati i.p. con BrdU (7,2 mg/kg, Sigma) 2h prima dell'analisi. Gli animali sono stati sacrificati e sono state isolate le cellule del midollo osseo, gli splenociti e le cellule del sangue periferico; queste cellule sono state marcate con anticorpi antiCD11b e successivamente si è effettuata la marcatura BrdU con un kit commerciale (BD Bioscience).

Estrazione di RNA da tessuto

Per l'estrazione dell'RNA totale da tessuto mammario è stato utilizzato il metodo che impiega il reagente Trizol (Trizol® Reagent, GibcoBRL). Questo reagente è una soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato, che durante l'omogeneizzazione o la lisi del campione mantiene l'integrità dell'RNA, mentre distrugge la cellula e dissolve i suoi componenti. Ogni biopsia tissutale viene risospesa in 1ml di Trizol e omogeneizzata con lo strumento Ultra-Turrax T25 (IKA®-Labor Technik). Il campione è incubato per 5' a temperatura ambiente per permettere la completa dissociazione dei complessi nucleoproteici; sono poi aggiunti 0,2ml di cloroformio (CHCl_3), agitato vigorosamente il campione per 15'' e incubato a temperatura ambiente per 2-3'. Il campione è quindi centrifugato a 14000rpm per 15' a +4°C. L'aggiunta del cloroformio, seguita dalla centrifugazione, separa la soluzione ottenuta in una fase acquosa e in una fase organica; l'RNA rimane esclusivamente nella fase acquosa. L'RNA viene precipitato aggiungendo un volume di isopropanolo nella proporzione di 1:1. Il campione è incubato per 10' a temperatura ambiente, ed in seguito centrifugato a 14000rpm per 20' a +4°C. L'RNA depositato sul fondo della provetta è lavato in etanolo al 75% e centrifugato a +4°C per 5' alla velocità di 9.000rpm. Terminata la centrifuga, si elimina il surnatante e si lascia asciugare il pellet a temperatura ambiente per circa 10'. Una volta essiccato, il pellet viene risospeso in H_2O bidistillata e sterile.

Una volta estratto l'RNA, gli viene controllata la quantità e la qualità. La quantità mediante dosaggio allo spettrofotometro (Nanodrop), il quale fornisce una stima della concentrazione dell'RNA ottenuto in $\text{ng}/\mu\text{l}$, ma dà anche informazioni importanti riguardo la qualità del nostro RNA, indicando i valori dei rapporti a 260/280 nanometri (che deve essere circa 2,0) e a 260/230 nanometri (che deve essere superiore a 1,3). Tali valori sono un buon indice di misura della contaminazione dell'RNA da proteine e da molecole come gli alcoli rispettivamente, rappresentando perciò una stima della sua purezza.

Preparazione del cDNA

Nell'esperimento di retrotrascrizione dei miRNA maturi l'RNA è sottoposto a trascrizione inversa utilizzando oligonucleotidi (looped RT primer) specifici per ogni singolo miRNA e con

una coda a forcina complementare al oligonucleotide impiegato nella successiva real-time PCR. Il cDNA viene sintetizzato da 25ng di RNA totale mediante la strategia prevista dal TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), secondo il protocollo sperimentale del produttore.

La mix di reazione del kit TaqMan microRNA assay dell'Applied Biosystems è così composta:

- dNTP mix (100mM) 0,075µl
- *Multiscribe*™ RT (50U/µl) 0,5µl
- 10X RT Buffer 0,75µl
- *RNase inhibitor* (20U/µl) 0,095µl

alla quale sono stati aggiunti: 1,5µL di oligonucleotidi specifici per il miR let-7c, 99a , 125b e lo “small nucleolar RNA” (snRNA) U6 (RNU6), usato come normalizzatore interno ed acqua RNasi-free fino al volume finale di 8µL. La mix di reazione è stata incubata 5' in ghiaccio, poi 30' a 16°C, 30' a 42°C, e 5' a 85°C

Real-Time PCR (qRT-PCR)

Principio della tecnica Similmente alle reazioni della tradizionale PCR, la Real-Time si basa sull'impiego di un enzima, la Taq Polimerasi, che catalizza la reazione di amplificazione di una particolare sequenza di DNA a partire da sequenze di innesco specifiche. Nel caso della Real-Time però, ad ogni ciclo, i prodotti di PCR accumulati vengono monitorati tramite l'impiego di fluorocromi la cui emissione di fluorescenza è proporzionale alla quantità di amplificato accumulato per ciascun campione. I metodi comuni di quantificazione includono l'uso delle molecole in grado di emettere un segnale di fluorescenza solo quando si intercalano con il DNA doppio-filamento (SYBR green I), oppure sequenze di innesco chimicamente modificate capaci di emettere fluorescenza una volta ibridate col DNA (sonde FAM, sonde VIC). Lo strumento di analisi della real time PCR include una macchina di PCR, una lampada che emette luce bianca per l'eccitazione dei campioni, una CCD camera in grado di detectare il segnale di emissione per ciascun campione a ciascun ciclo di amplificazione, un software in grado di elaborare i dati ottenuti producendo come risultato una curva di amplificazione. La curva di amplificazione, di andamento sinusoidale, rappresenta l'andamento per ciascun campione del segnale di fluorescenza relativo ad ogni ciclo di PCR.

La PCR può essere suddivisa in quattro fasi principali

fase iniziale lineare (primi 10-15 cicli): la PCR è cominciata e l'emissione della fluorescenza non supera ancora il “background” o linea base.

fase esponenziale: ad ogni ciclo (assumendo un'efficienza di reazione del 100%) la quantità del prodotto di PCR raddoppia. A questo punto la reazione è altamente specifica e la fluorescenza emessa supera il livello di base

fase logaritmica: i componenti di reazione si vanno esaurendo e la reazione rallenta

fase di “plateau”: la mancanza dei componenti diventa un fattore limitante per il proseguimento della reazione e l'intensità della fluorescenza non è più utile per l'analisi dei dati.

Le misurazioni che servono per il calcolo delle quantità di prodotto, vengono effettuate a livello della fase esponenziale.

Quando si analizza un grafico di amplificazione di Real-Time PCR, bisogna tener conto di tre parametri importanti: a) la linea base della fluorescenza (“baseline”), che corrisponde all'intervallo dei primi cicli di dove il segnale di fluorescenza non è rilevabile e la reazione di PCR non è esattamente esponenziale. L'estremo superiore dell'intervallo selezionato (per es. il ciclo 15) indica il valore al di sopra del quale inizia l'accumulo lineare di un amplificato; b) la linea soglia (“threshold”), parallela alla linea base, impostata dall'operatore o dalla stessa macchina in modo tale da intersecare le curve di tutti i campioni nella fase esponenziale; c) il ciclo soglia o Ct (“cycle threshold”), specifico per ogni campione, che identifica il ciclo di PCR in cui la curva in fase esponenziale interseca la linea soglia. Il ciclo soglia è un indice preciso poiché esiste una correlazione lineare tra il suo valore e il logaritmo della quantità iniziale di DNA template. La pendenza di questa linea fornisce inoltre una misura dell'efficienza della PCR.

Real Time con utilizzo di sonde specifiche FAM (TaqMan). Le sonde TaqMan sono sonde ad ibridazione specifica per il frammento di interesse, marcate con molecole fluorescenti. Si tratta di oligonucleotidi che vengono disegnati per essere complementari alla sequenza bersaglio da amplificare. La sonda è disegnata in modo da ibridarsi all'interno del frammento amplificato nella reazione di PCR. Il principio della reazione si basa sull'utilizzo di una sonda costituita da un oligonucleotide che contiene all'estremità 5' un marcatore fluorescente chiamato *reporter* e al 3' un *quencher* (un gruppo colorante in grado di mascherare l'emissione luminosa). Quando colpita dalla luce, la molecola fluorescente in 5' trasferisce energia al *quencher* il quale determina una inibizione della fluorescenza del substrato. Durante il processo di amplificazione l'attività esonucleasica 5'-3' della Taq-polimerasi scalza la sonda determinando la separazione del *reporter* dal *quencher*, con una conseguente emissione di fluorescenza.

Procedura sperimentale La q-PCR per i miRNA maturi è stata effettuata con 1,5µl di cDNA, TaqMan Universal Master Mix (Applied biosystems), specifici oligonucleotidi e sonde MGB-FAM (miRNA TaqMan Assay Kit, Applied Biosystems). L'espressione dei miRNA maturi di

interesse è stata misurata mediante oligonucleotidi e sonda specifici, sintetizzati dalla ditta Applied Biosystem. Poichè le sequenze dei miRNA analizzati in questo studio sono conservate fra topo ed uomo sono state acquistati dall' Applied Biosystems oligonucleotidi e sonde utili per l'amplificazione di questi miRNA in entrambe le specie. Le reazioni di amplificazione per ciascun campione sono state effettuate in triplicato in un volume finale di 20µl contenente 1,5µl del prodotto di retro-trascrizione specifico per il miRNA, 10µl di TaqMan® *Universal PCR Master Mix* 2X (Applied Biosystem), 1µl di una mix di sonda TaqMan® 200nM, oligonucleotidi senso ed antisense 20X (Applied Biosystem) e acqua DNasi- ed RNasi-free. Il ciclo di amplificazione usato è quello standard, che prevede una prima fase di 2' a 50°C, una seconda fase di 10' a 95°C seguita da una successione di 40 cicli a 95°C per 15'' e 60°C per 1' ognuno. I dati ottenuti sono stati analizzati con il metodo comparativo dei $\Delta\Delta C_t$ o delle *fold change*. Per l'espressione del cluster let-7c, la normalizzazione è stata fatta con sonde e primers specifici per l'RNU6 (Applied Biosystem).

Analisi Statistica

La deviazione standard indicata nei grafici relativi ai dati di "imaging", è stata calcolata utilizzando l'errore standard della media (*Standard Error of the Mean, S.E.M*).

Per ogni esperimento di Real-Time, i risultati sono espressi come media aritmetica di 2 esperimenti indipendenti, $\pm$ errore standard della media (*Standard Error of the Mean, S.E.M*). La significatività statistica è stata calcolata usando il test t di Student. Valori di $P < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

RISULTATI

“Imaging” del tessuto mammario nel modello animale MITO+/NeuT+ durante la progressione neoplastica

Come descritto nell'introduzione il modello animale murino MITO-Luc permette di analizzare tutti i distretti contenenti cellule proliferanti nell'intero animale (Goeman *et al.*, 2012). Inoltre, poichè la tecnica non necessita il sacrificio dell'animale, è possibile seguire la proliferazione cellulare in questi animali durante tutto l'arco della loro vita. Dunque se il MITO-Luc è incrociato con un modello animale di malattia, sarà possibile seguire l'andamento della proliferazione cellulare sia nell'intero organismo che nel tessuto bersaglio della malattia, durante l'arco temporale in cui essa si sviluppa.

Poichè una proliferazione deregolata ed aberrante è alla base dello sviluppo della maggior parte dei tumori, ci siamo chiesti se fosse possibile identificare stadi precoci dello sviluppo tumorale utilizzando il modello MITO-Luc incrociato con un modello geneticamente modificato che sviluppa tumore alla mammella; MMTV-NeuT (Boggio *et al.*, 1998). Per rispondere a questa domanda abbiamo incrociato topi MITO-Luc con topi MMTV-NeuT ambedue nel ceppo FVB (Taketo *et al.*, 1991). Le generazioni nate in seguito all'incrocio dei topi FVB MITO+/NeuT- X MITO-/NeuT+, sono state genotipizzate come descritto nei materiali e metodi e individui femmine FVB MITO+/ NeuT+ e femmine FVB MITO+/ NeuT- come controllo negativo, sono state utilizzate negli esperimenti successivi. In figura 11 è mostrato un esempio del risultato delle PCR utilizzate per genotipizzare ciascun ceppo transgenico.

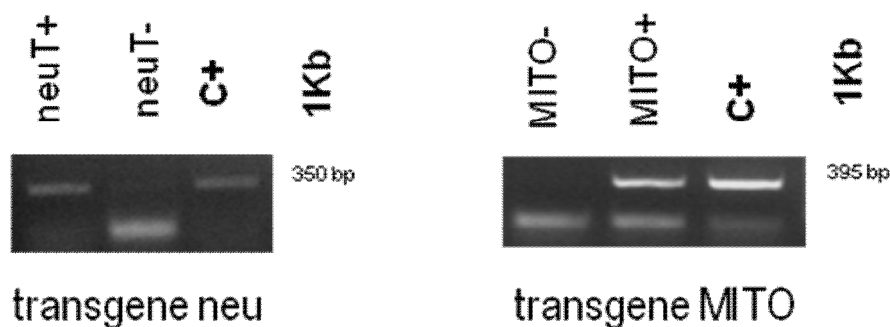


Figura 11 Genotipizzazione tramite PCR. Nella figura è rappresentata la corsa elettroforetica del prodotto di PCR ottenuto utilizzando i primers specifici per il transgene neu (sx) e il transgene MITO (dx) su gel d'Agarosio al 2%. La colorazione è stata effettuata con Bromuro di etidio. Sono mostrati 2 campioni, il rispettivo controllo positivo, il maker (1Kb) con le rispettive “size”.

Allo scopo di valutare l'andamento della proliferazione cellulare nell'intero animale e nel tessuto mammario durante la progressione del carcinoma mammario, 36 topi femmina MITO+/NeuT+ sono stati sottoposti a sedute di “imaging” una volta alla settimana a partire dal 48° giorno di vita (7^a settimane) fino alla 18^a settimana di vita (vedi materiali e metodi). Inoltre, come controllo

dell'esperimento 21 topi femmina MITO+/NeuT- sono stati sottoposti a sedute di "imaging" agli stessi tempi.

Inizialmente abbiamo analizzato l'incidenza di tumori in questi topi. Come mostrato nella tabella 3, il 100% dei topi MITO+/NeuT+ da noi analizzato (36 individui) va incontro a tumorigenesi mammaria in tutte e dieci le mammelle intorno alla 16^a settimana di vita come atteso (Boggio *et al.*, 1998). Al contrario nessun animale MITO+/NeuT- da noi analizzato (21 individui) sviluppa tumore in nessuna delle mammelle.

	N° Topi	Topi che sviluppano Tumore Mammario	Topi senza tumore/Topi con tumore	Tempo di latenza per lo sviluppo dei tumori (Settimane)
MITO+/NeuT+	36	36/36 (100%)	0/36 (0%)	15^a÷17^a
MITO+/NeuT-	21	0/21 (0%)	21/0 (100%)	

Tabella 3. Sviluppo di tumori mammarici in topi MITO/NeuT. In rosso i topi doppi transgenici esaminati fino alla 18^a settimana di vita, in blu topi MITO+/neuT-utilizzati come controllo.

Il principale obiettivo di questo progetto di tesi è quello di identificare stadi precoci della tumorigenesi mammaria. Al fine di capire se il modello murino MITO/NeuT fosse utile per questo scopo abbiamo analizzato i dati derivati dalle sedute di "imaging" a livello delle mammelle durante tutto l'arco dell'esperimento (7^a settimana÷18^a settimana). Sorprendentemente, come mostrato nel grafico in figura 12 i dati da noi derivati da queste sedute di imaging in individui intatti, non hanno messo in evidenza un aumento di luminescenza/proliferazione a livello delle mammelle, nemmeno alle settimane in cui il tumore era palpabile.

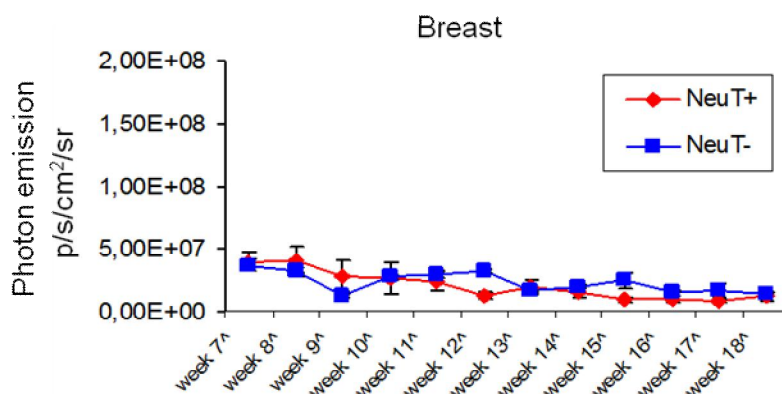


Figura 12. Comparazione dell'andamento della luminescenza/proliferazione nelle mammelle dei modelli animali MITO+/NeuT+ e MITO+/NeuT-. I grafici rappresentano la media della luminescenza emessa dalle mammelle di tutti gli animali analizzati nelle diverse settimane. Sull'asse delle ascisse è indicata la settimana alla quale sono state effettuate le sedute di "imaging". Sull'asse delle ordinate è riportato il numero di fotoni emessi al secondo (p/s) per cm² in scala logaritmica. La deviazione standard, calcolata come descritto nei materiali e metodi, è riportata per tutti i punti analizzati. Come indicato nella leggenda la linea di colore rosso corrisponde al topo doppio transgenico, mentre la linea di colore blu rappresenta il nostro controllo.

Ci siamo allora chiesti se fossimo in grado di evidenziare luminescenza/proliferazione nelle mammelle a queste settimane in esperimenti di *ex-vivo*. A questo scopo le mammelle dei topi MITO+/NeuT+ sono state prelevate alla 18^a settimana e sottoposte ad "imaging". La figura 13 mostra un esempio di questi esperimenti condotti sui topi MITO+/NeuT+.

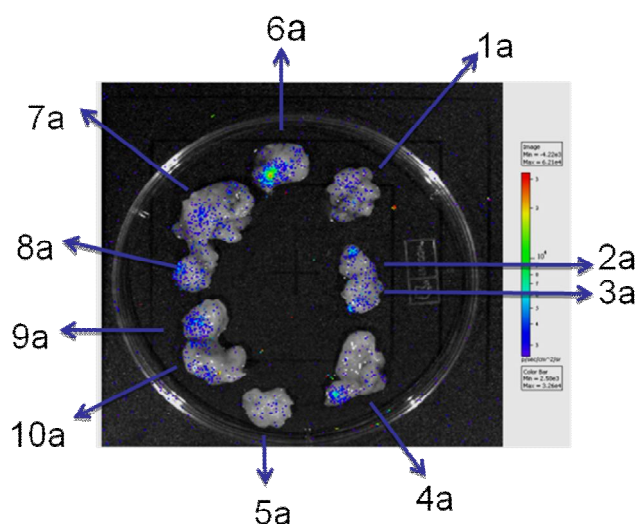


Figura 13. Imaging *ex vivo* di tumori mammari. In figura viene mostrato l'indice di luminescenza dei tumori prelevati da ognuna delle 10 mammelle di un topo rappresentativo del modello MITO+/neuT+. Si notano delle zone circoscritte delle masse tumorali in cui è presente luminescenza.

Come mostrato in figura 13 l'analisi di "imaging" dei tumori *ex vivo* evidenzia, seppur in zone circoscritte delle masse tumorali, un aumento della luminescenza/proliferazione. L'analisi *ex vivo* delle mammelle a tutti i tempi in cui sono state sottoposte ad "imaging", per verificare se ci fosse un'anda proliferativa durante la progressione tumorale, è oggetto di studio.

Nel loro insieme i risultati provenienti dagli esperimenti *in vivo* ed *ex vivo*, indicano che la proliferazione cellulare a livello delle mammelle non gioca un ruolo chiave nella progressione del tumore mammario.

“Imaging” della proliferazione cellulare sistemica nel modello animale MITO+/NeuT+ durante la progressione neoplastica

I dati da noi derivati, in seguito alle sedute di “imaging”, indicano che durante la progressione tumorale dalla 7^a alla 18^a settimana di vita, è possibile evidenziare in precisi momenti temporali onde di aumento di luminescenza in corrispondenza dei femori, dello sterno (dati non mostrati) e della milza dell’animale.

Infatti abbiamo dimostrato che l’incremento di luminescenza registrato, corrisponde ad un aumento della proliferazione delle cellule del midollo osseo presente in tutti questi distretti. Dunque in questi animali la luminescenza è un surrogato utilizzato per indicare proliferazione. In figura 14 sono riportate le immagini relativi ad un animale rappresentativo di tutti gli altri.

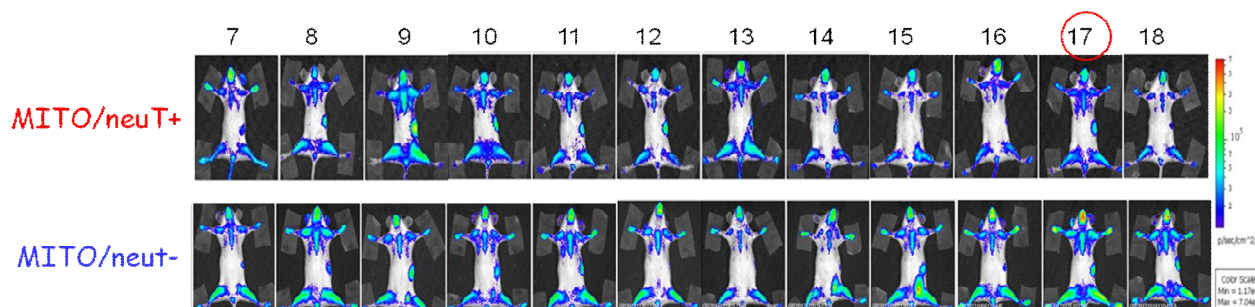


Figura 14. Imaging bioluminescente di due animali rappresentativi dei modelli MITO+/NeuT+ e MITO+/NeuT- . In figura sono mostrate le immagini rappresentative di un topo femmina doppio-transgenico (rosso) e di un topo di controllo (blu) sottoposti a sedute di imaging lungo un arco temporale della loro vita. I numeri in alto rappresentano le settimane di vita dell’animale. Il cerchio rosso indica la settimana di comparsa del tumore e sulla destra è indicata la scala logaritmica con cui viene misurata la luminescenza.

I grafici in figura 15 sono il risultato dell'analisi di tutti gli individui analizzati, 36 per il modello MITO+/NeuT+ e 21 per il modello MITO+/NeuT-. In particolare i grafici indicano i livelli di luminescenza (e quindi di proliferazione) emessa dai femori e dalla milza di topi MITO+/NeuT+ rispetto a topi MITO+/NeuT-, utilizzati come controllo. È evidente che alla 7^a settimana di vita tutti gli animali hanno un indice di proliferazione equiparabile in questi due distretti. Al contrario, nei topi MITO+/NeuT+ nella settimana successiva, e fino alla 9^a settimana in cui si raggiunge il picco massimo, si registra un incremento della luminescenza/proliferazione non presente nei topi di controllo. Alla 10^a settimana la luminescenza/proliferazione nell’animale MITO+/NeuT+ diminuisce per aumentare poi progressivamente alla 11^a e 12^a settimana fino a raggiungere il picco massimo alla 13^a settimana. In contrasto, l’indice di proliferazione nei topi di controllo rimane pressoché costante in queste settimane.

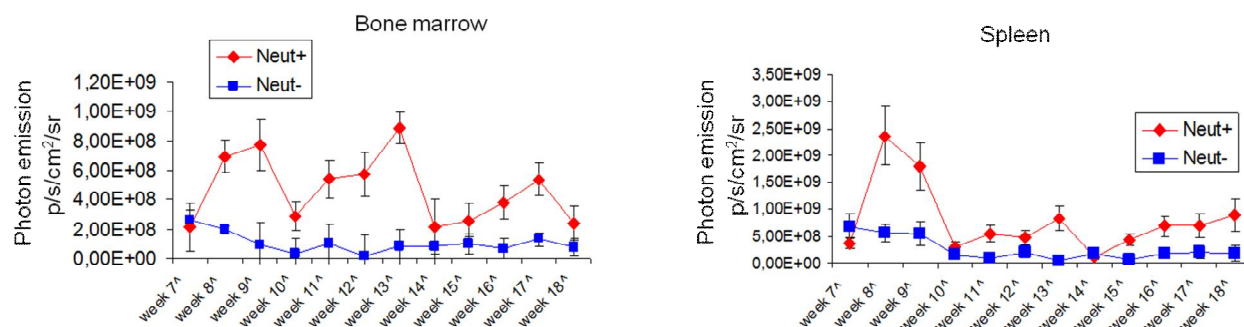


Figura 15. Comparazione dell'andamento della luminescenza/proliferazione nei femori e nella milza dei modelli animali MITO+/NeuT+ e MITO+/NeuT-. I grafici rappresentano la media della luminescenza emessa dai femori e dalla milza nelle diverse settimane di tutti gli individui analizzati nello studio. Sull'asse delle ascisse è indicata la settimana alla quale sono state effettuate le sedute di "imaging". Sull'asse delle ordinate è riportato il numero di fotoni emessi al secondo (p/s) per cm² in scala logaritmica. La deviazione standard, calcolata come descritto nei materiali e metodi, è riportata per tutti i punti analizzati. Come indicato nella leggenda la linea di colore rosso corrisponde al topo doppio transgenico, mentre la linea di colore blu rappresenta il nostro controllo negativo.

Alla 14^a settimana si nota un decremento della luminescenza/proliferazione sia nei femori che nella milza dei topi MITO+/neuT+. Dalla 15^a settimana in poi le masse tumorali cominciano ad essere palpabili e contemporaneamente si assiste ad un progressivo aumento della luminescenza/proliferazione. Alla 17^a settimana, quando il tumore è conclamato, si ha il picco massimo di questa terza onda di luminescenza/proliferazione. Ancora una volta nei topi utilizzati come controllo, che non svilupperanno mai tumore, non si nota alcuna variazione significativa della luminescenza/proliferazione in questi distretti. Alla 18^a settimana i topi MITO+/NeuT+ sono stati sacrificati e soggetti ad autopsia con prelievo di liquidi biologici, organi e tumori (vedi materiali e metodi).

Poichè', come abbiamo precedentemente descritto, in questi animali la luminescenza proveniente dai femori dalla milza è indice di proliferazione di cellule del midollo osseo, questi dati dimostrano che durante lo sviluppo del tumore esistono onde di proliferazione di cellule del midollo osseo negli stadi preneoplastici. Poichè il midollo osseo e la milza sono organi deputati allo sviluppo delle principali componenti del nostro sistema immunitario, questi dati suggeriscono anche che durante la progressione tumorale il tessuto mammario sia in grado di liberare segnali che portano all'attivazione del sistema immunitario. Questi dati non ci permettono però di sapere ancora se la proliferazione è a carico di progenitori della linea mieloide e/o linfoide.

Analisi immunofenotipica delle cellule del midollo osseo e della milza nelle fasi precoci della progressione tumorale

Per confermare l'aumentata proliferazione di cellule nel midollo osseo e nella milza dei topi MITO NeuT+ alla 9^a settimana, in cui si raggiunge il picco massimo di luminescenza, abbiamo eseguito degli studi di incorporazione 5- bromo-2-deossiridina (BrdU) *in vivo*. Due ore prima del sacrificio, agli animali è stata somministrata per iniezione intraperitoneale la 5- bromo-2-deossiridina (BrdU), un analogo sintetico della timidina che viene incorporato nell'elica del DNA nascente, permettendo di calcolare il tasso proliferativo delle cellule di tutti i distretti tissutali. Una volta sacrificati gli animali, le cellule della milza, del midollo osseo e del sangue periferico sono state isolate, sono state decorate con un anticorpo fluorescente anti BrdU e, per cominciare a capire quale sotto tipo di cellule fossero quelle che incorporavano più BrdU, con anticorpi anti CD11b e anti-Gr-1, rispettivamente. Le cellule così decorate sono state analizzate al citofluorimetro. I dati in figura 16 mostrano che in tutti e tre i distretti analizzati provenienti dai topi MITO NeuT+, esiste una distinta popolazione di cellule che incorpora BrdU ed è positiva all'anticorpo CD11b in misura maggiore rispetto alle stesse cellule provenienti da animali MITO NeuT- (Figura 16). In particolare nelle cellule di midollo osseo e del sangue periferico la popolazione BrdU+/CD11b+ nei topi MITO+ NeuT+ è circa il doppio rispetto alla stessa popolazione MITO+ NeuT-. Mentre le differenze risultano meno marcate nella milza. Gli stessi esperimenti condotti con anticorpi anti-Gr-1 non hanno messo in evidenza nessuna differenza significativa fra le cellule dei topi MITO NeuT+ e quelle dei topi MITO NeuT- (dati non mostrati), indicando che la luce evidenziata a livello sistemico nel topo MITO NeuT+ alla nona settimana di vita sia principalmente dovuta ad un'espansione delle cellule mieloidi. Ulteriori studi sono in corso per delineare quale sub-frazione cellulare della linea mieloide è responsabile dell'aumento della proliferazione cellulare sistemica nel modello animale MITO+/NeuT+ durante la progressione neoplastica.

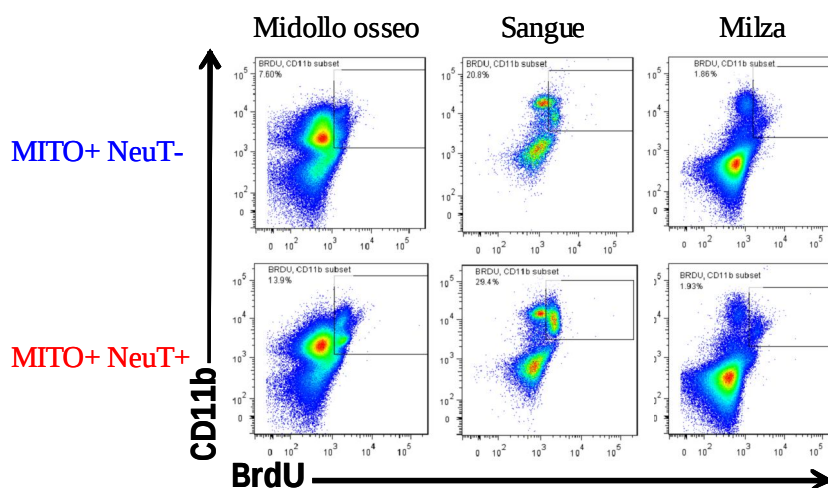


Figura 16. Caratterizzazione fenotipica delle cellule di midollo osseo, sangue e milza. Analisi del potenziale proliferativo e del marcatore di superficie CD11b in sottopopolazioni di splenociti, cellule di midollo osseo e cellule del sangue provenienti da topi NeuT+ e NeuT-. La proliferazione è stata misurata *in vivo* attraverso l'incorporazione di 5-bromo-2-deossiuridina (BrdU) valutato 2 ore dopo la sua somministrazione per via intraperitoneale.

Raccolta di biopsie liquide e solide nel modello animale MITO+/NeuT+ durante la progressione neoplastica

Un'ulteriore obiettivo di questo progetto di tesi di dottorato, è quello di caratterizzare alterazioni geniche associate con gli stadi precoci della progressione tumorale mammaria al fine di capire se una o più di queste alterazioni possa essere utile come biomarcatore precoce di malattia. Al fine di ottenere materiale biologico da utilizzare per la successiva analisi molecolare degli stadi precoci della progressione neoplastica, è stato effettuato il prelievo di organi e liquidi biologici da 10 topi MITO+/NeuT+ e 10 topi MITO+/NeuT-. In particolare ci siamo concentrati sulle settimane nelle quali sono stati individuati i picchi di proliferazione sistemica mostrati nella figura 15; 9^a 13^a e 17^a settimana, rispettivamente. Ad ogni settimana è stato raccolto il tessuto mammario, la milza, il midollo osseo proveniente dai femori ed il siero (vedi materiali e metodi). Inoltre, in alcuni casi, nei topi MITO+/neuT+ alla 17^a settimana sono state raccolte sia ghiandole mammarie trasformate sia mammelle che non presentavano ancora evidenti segni di trasformazione (Tabella 4).

Settimana	Genotipo Topi	n° Biopsie Mammella Non Trasformata	n° Biopsie Mammella Trasformata	n° Pellett cellulari da Midollo	n° Aliquote Siero	n° Biopsie spleniche
9a	MITO+/neuT-	100	0	10	10	10
	MITO+/neuT+	100	0	10	10	10
13a	MITO+/neuT-	100	0	10	10	10
	MITO+/neuT+	100	0	10	10	10
17a	MITO+/neuT-	100	0	10	10	10
	MITO+/neuT+	6	94	10	10	10

Tabella 4. Tabella riassuntiva della raccolta di biopsie liquide e solide. In rosso topi doppi transgenici, in blu topi MITO+/NeuT-utilizzati come controllo. La tabella mostra il numero approssimativo di biopsie che sono state collazionate durante lo studio.

Come descritto nella sezione che segue, per gli esperimenti condotti durante questo lavoro di tesi sono stati utilizzati alcuni dei tessuti mammari raccolti. È però importante notare che l'intera raccolta dei diversi organi e del siero saranno utili per lo svolgimento di diversi progetti che si stanno attuando nel laboratorio. In particolare, utilizzando i sieri raccolti in questo studio, si

stanno mettendo a punto tecniche per identificare biomarcatori circolanti utili ad una possibile diagnosi precoce del carcinoma mammario.

Livelli di espressione di specifici microRNA nella progressione del carcinoma mammario

Tra le molecole biologiche oggi studiate come possibili biomarcatori precoci di progressione tumorale emergono i microRNA (miRNA) (O'Day *et al.*, 2010, Croce *et al.*, 2013). In particolare diversi esempi sono presenti in letteratura che mostrano come un'espressione deregolata di queste molecole possa essere indicativa della progressione di malattie (Le Quesne *et al.*, 2010, Zhong *et al.*, 2012). Dunque, al fine di identificare biomarcatori molecolari utili alla diagnosi precoce del tumore mammario è stata analizzata l'espressione di specifici miRNA già descritti avere un ruolo diagnostico e/o funzionale nel cancro al seno (Tang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014). Fra i diversi miRNA già descritti ci siamo focalizzati sul cluster let-7c, miR-99a, miR-125b. Questa scelta deriva dal fatto che il ruolo biologico di queste molecole è stato già ampiamente studiato nel laboratorio presso cui è stato svolto questo lavoro (Careccia *et al.*, 2009; Pelosi *et al.*, 2013; Pelosi *et al.*, 2014). Tutte e tre le molecole condividono un'attività biologica di oncosoppressori. Questa caratteristica li rende interessanti ai fini del nostro studio perchè è possibile immaginare che negli stadi molto precoci di trasformazione cellulare queste molecole tentino di contrastare la trasformazione. Nei momenti più avanzati della trasformazione cellulare è ragionevole pensare che i livelli di espressione di queste molecole siano diminuiti.

Al fine di misurare i livelli di espressione di questi miRNA nel tessuto mammario alle diverse settimane sono stati isolati gli RNA dalle biopsie mammarie raccolte alla 9^a 13^a e 17^a settimana di vita sia dai topi MITO+/NeuT+ che da quelli MITO+/NeuT-.

La quantificazione dei livelli di espressione dei miRNA è stata valutata grazie all'utilizzo della tecnica di retro trascrizione miRNA-specifica accoppiata a Real-Time-PCR (qRT-PCR; vedi materiali e metodi). In ciascun degli esperimenti di seguito descritti, sono stati mischiati RNA provenienti dalle mammelle di tre diversi topi. I risultati di due esperimenti indipendenti condotti in triplicato sono mostrati in figura 17, 18 e 19. Abbiamo messo in evidenza che l'espressione di questi tre miRNA sale nelle mammelle dei topi che non svilupperanno tumore al progredire dell'età (figura 17). Al contrario, nelle mammelle dei topi che svilupperanno tumore abbiamo osservato una generale diminuzione dei livelli di let7c ed un andamento costante dei livelli di espressione dei miR-99a e 125b (figura 18). È interessante notare che in tutte le settimane analizzate i livelli di tutti e tre i miRNA studiati sono più bassi nei topi che svilupperanno tumore rispetto a quelli che non lo faranno (confronta le scale sulle ordinate dei due grafici).

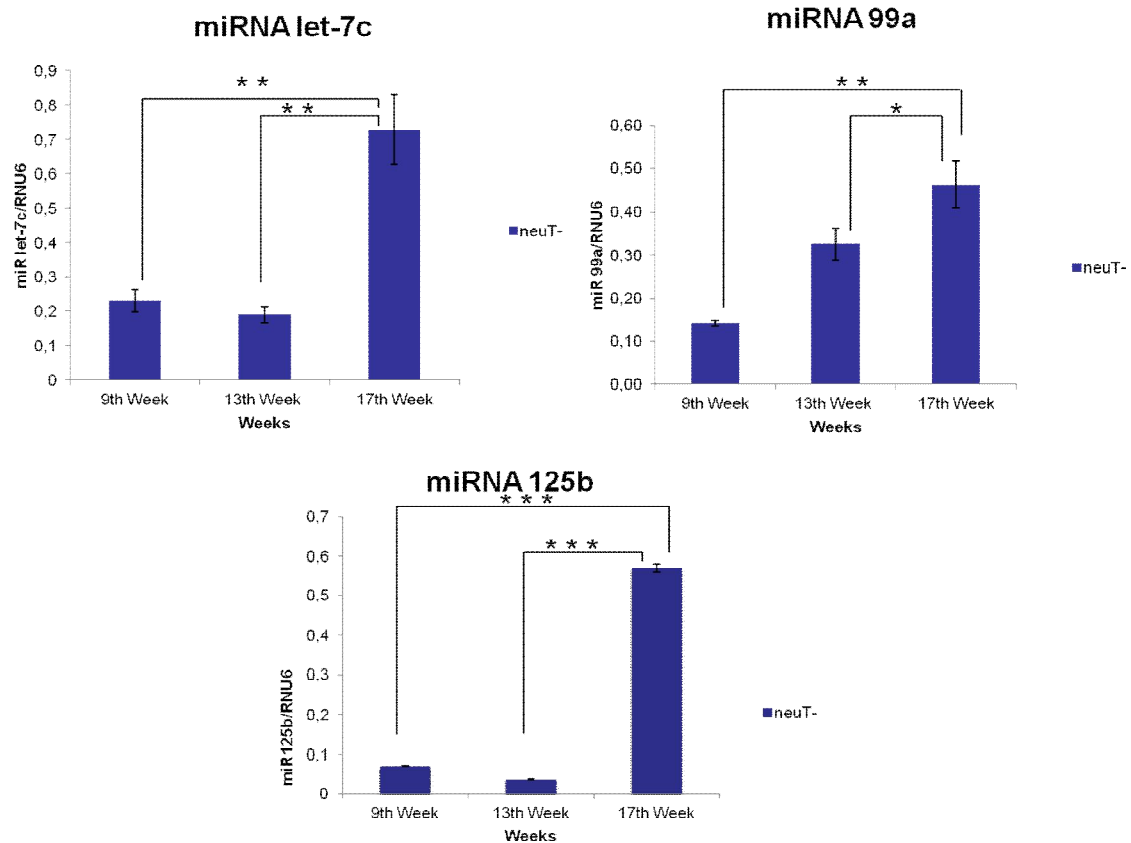


Figura 17. Espressione di let-7 c, miR-99a e miR-125b in topi MITO/NeuT-. In figura vengono mostrati i livelli di espressione dei miRNA indicati. I livelli d'espressione di ciascun miRNA sono stati normalizzati utilizzando il snRNA U6. La deviazione standard indicata è stata calcolata come descritto nei materiali e metodi. I valori di $P < 0,05$, statisticamente significativi, sono indicati con gli asterischi (*).

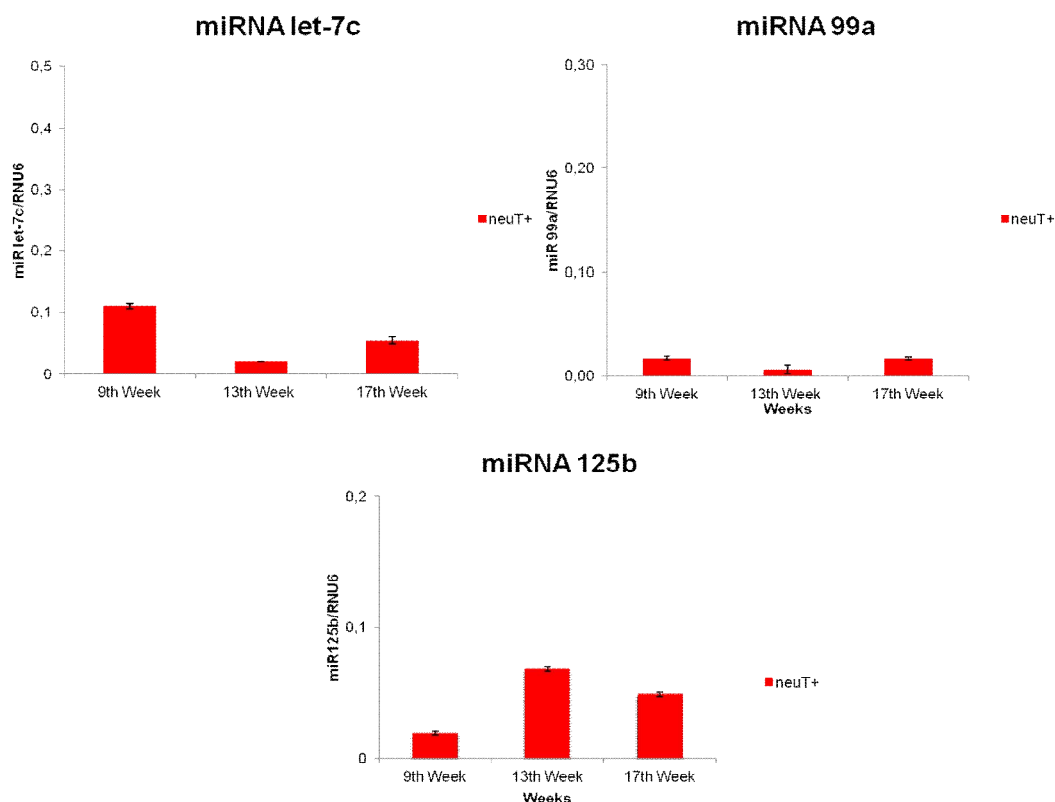


Figura 18. Espressione di let-7c, miR-99a e miR-125b in topi MITO+/NeuT+. In figura vengono mostrati i livelli di espressione dei miRNA indicati. I livelli d'espressione di ciascun miRNA sono stati normalizzati utilizzando il snRNA U6. La deviazione standard indicata è stata calcolata come descritto nei materiali e metodi. I valori di $P < 0,05$, statisticamente significativi, sono indicati con gli asterischi (*).

Infine i livelli di espressione di let-7c e miR-99a sono stati misurati utilizzando RNA provenienti da ghiandole mammarie di topi MITO+/NeuT+ che non presentavano ancora evidenti segni di trasformazione alla 17^a settimana. In ogni esperimento, queste ghiandole mammarie sono state prelevate dagli stessi tre topi da cui è stata prelevata la ghiandola mammaria trasformata. I livelli di espressione di questi due miRNA sono risultati più bassi dei livelli riscontrati in ghiandole sane ma più alti di quelli riscontrati in ghiandole che presentavano tumore (figura 19).

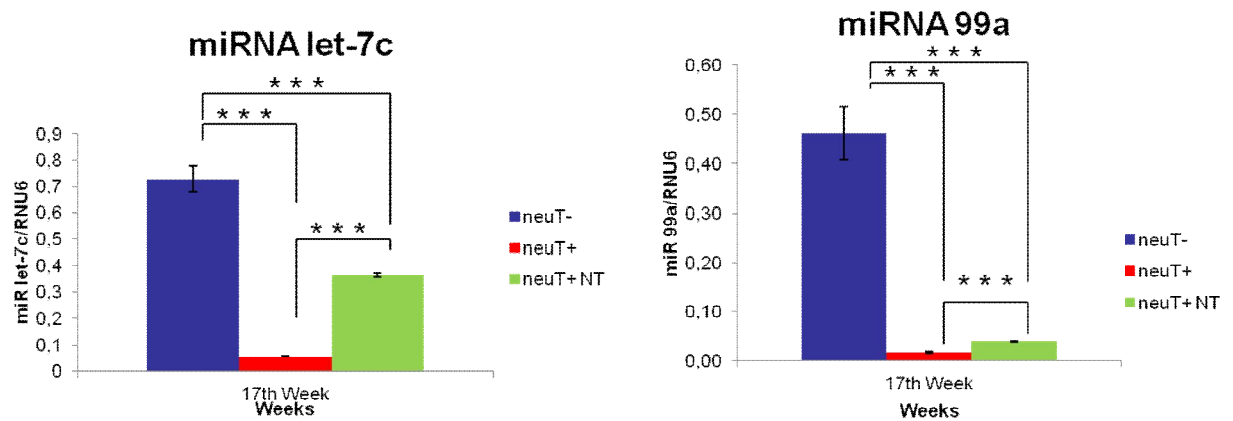


Figura 19. Espressione di let-7c e miR-99a in topi MITO+/NeuT+ e MITO+/NeuT-. In figura vengono mostrati i livelli di espressione dei miRNA indicati. I livelli d'espressione di ciascun miRNA sono stati normalizzati utilizzando il snRNA U6. Come indicato nella leggenda i neuT+ sono rappresentati in rosso, i neuT- sono rappresentati in blu e i neuT+ NT rappresentano i campioni derivati dalle biopsie di mammelle non trasformate prelevate dagli stessi 3 topi neuT+ oggetto di analisi (barre rosse). La deviazione standard indicata è stata calcolata come descritto nei materiali e metodi. I valori di $P < 0,05$, statisticamente significativi, sono indicati con gli asterischi (*).

Sebbene questi dati siano preliminari e vadano ripetuti allargando la casistica, nell'insieme questi risultati suggeriscono che la diminuita espressione dei tre miRNA presi in esame in questo studio, possa essere considerata un indicatore diagnostico precoce per il carcinoma mammario.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il carcinoma mammario è il tumore maligno più frequente nelle donne. Il tumore mammario è una patologia eterogenea, caratterizzata da molti sottotipi tumorali con caratteristiche biologiche differenti correlate ad una risposta al trattamento ed esiti clinici altrettanto diversificati (Yersal *et al.*, 2014). I sistemi di classificazione tradizionali si basano sulle caratteristiche biologiche come ad esempio le dimensioni del tumore, il coinvolgimento dei linfonodi, l'aspetto istologico, lo stato di attivazione di diversi recettori ormonali e chinasi (Yersal *et al.*, 2014). La prognosi delle pazienti con cancro al seno è fortemente associata alla diagnosi precoce e per questo l'identificazione di biomarcatori specifici per le prime fasi dello sviluppo del tumore diventa indispensabile per migliorare l'andamento della malattia. Sebbene i metodi ad oggi ampiamente utilizzati per la diagnosi del cancro al seno, come la mammografia e la risonanza magnetica, abbiano aumentato il numero di diagnosi precoci, la sensibilità di questi sistemi resta bassa. Purtroppo attualmente il numero complessivo di biomarcatori disponibili clinicamente utili è ancora molto limitato.

Il razionale di questo progetto si basa sulla considerazione che, pur essendo la tumorigenesi un processo biologico dinamico, gli strumenti adottati fino ad oggi per indagarlo hanno consentito solo una caratterizzazione statica di esso. Infatti, fino ad ora, le alterazioni geniche che caratterizzano una progressione tumorale sono state studiate confrontando tessuti trasformati verso la controparte normale. In questo progetto di tesi si è cercato di superare questa problematica utilizzando tecnologie di imaging in modelli murini geneticamente modificati al fine di seguire lo sviluppo del cancro al seno in maniera spazio-temporale nell'intero individuo lungo tutto l'arco della vita.

A questo fine abbiamo utilizzato un modello murino (MITO-Luc reporter mice), in cui è possibile visualizzare eventi di proliferazione attraverso la tecnica non invasiva del Bio-Luminescence-Imaging (BLI). Per identificare stadi precoci dello sviluppo tumorale abbiamo incrociato questo modello con un modello geneticamente modificato che sviluppa tumore alla mammella; MMTV-neuT (Boggio *et al.*, 1998). Grazie all'impiego di questo modello abbiamo visualizzato l'evoluzione temporale del tumore mammario nell'ambito dell'intero animale sin dai primi stadi della malattia ed abbiamo dimostrato che durante lo sviluppo del tumore esistono onde di proliferazione di cellule del midollo osseo negli stadi preneoplastici. Poiché il midollo osseo e la milza sono organi deputati allo sviluppo delle principali componenti del nostro sistema immunitario, questi dati suggeriscono che durante la progressione tumorale il tessuto mammario liberi dei segnali che portano all'attivazione del sistema immunitario. Sorprendentemente, i risultati derivanti da esperimenti di imaging sul tessuto mammario indicano che la proliferazione

cellulare a livello delle mammelle non giochi un ruolo chiave nella progressione del tumore. Questo risultato può però essere spiegato con varie ipotesi. È noto infatti che alcune parti dei tumori sono zone ipossiche o necrotiche dove non è attesa una intensa attività proliferativa delle cellule. È però anche possibile pensare che la proliferazione avvenga in questi tumori con una dinamica spazio-temporale molto precisa motivo per il quale non abbiamo messo in evidenza alti livelli di luminescenza/proliferazione nelle sedute di “imaging” effettuate una volta alla settimana. Inoltre è anche possibile che la proliferazione non abbia un impatto primario nella tumorigenesi mammaria in questo particolare modello genetico. Stiamo pianificando esperimenti per cercare di capire se una o più di queste ipotesi è quella reale. A questo fine le mammelle dei topi MITO+/NeuT+ saranno prelevate a tre individui diversi a giorni alternati e soggette a sedute di “imaging” *ex vivo* nelle settimane precedenti la 18^a. A questi tempi infatti la necrosi nei tumori dovrebbe essere meno evidente lasciando spazio alla proliferazione cellulare. Inoltre, si stanno pianificando esperimenti di immunoistochimica condotti sulle mammelle prelevate ai diversi tempi. In questi esperimenti si cercherà di analizzare il segnale proveniente da un anticorpo anti-luciferasi e di compararlo con quello derivato dall’uso di un anticorpo specifico per un ben noto marcatore di proliferazione come il Ki-67. Inoltre, per capire il reale impatto della proliferazione cellulare in questi tumori, mammelle derivate dal modello MITO+/NeuT- verranno sottoposte alla stessa analisi di “imaging” *ex vivo*. Questi esperimenti prevedono l’uso di un numero elevato di animali poichè diversi individui dovranno essere sacrificati ad ogni punto sperimentale previsto per le sedute di “imaging”.

In conclusione, utilizzando questo approccio, siamo stati in grado di visualizzare specifici stadi precoci di trasformazione pre-neoplastica, in cui possono avvenire eventi molecolari necessari alla trasformazione. Questi stadi sono caratterizzati da onde proliferative sistemiche del midollo osseo che indicano una risposta di tipo immunologico dell’ organismo all’attuarsi della cancerogenesi. Dunque il modello animale descritto in questo progetto di tesi rappresenta un’opportunità senza precedenti per caratterizzare le alterazioni molecolari che avvengono in stadi tumorali precoci che non possono essere identificati con i metodi tradizionali ma che possono fornire informazioni rilevanti in relazione alla progressione del cancro al seno. I nostri dati preliminari, che mostrano come una diminuita espressione dei tre miRNA presi in esame in questo studio possa essere un indicatore diagnostico precoce per il tumore mammario, procedono in questa direzione.

BIBLIOGRAFIA

- Alimandi M, Romano A, Curia MC (1995) Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas. *Oncogene*. 10:1813-21.
- Ambros V (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature*. 16:350-5.
- Astolfi A, Landuzzi L, Nicoletti G, De Giovanni C, Croci S, *et al.*, (2005) Gene Expression Analysis of Immune-Mediated Arrest of Tumorigenesis in a Transgenic Mouse Model of HER-2/neu-Positive Basal-Like Mammary Carcinoma. *Am J Pathol*. 166:1205–1216.
- Bailey ST, Westerling T, Brown M (2014) Loss estrogen-regulated microRNA expression increases HER2 signaling and is prognostic of poor outcome in luminal breast cancer. *Cancer Res*. Epub ahead of print
- Barh D., Malhotra R., Ravi B., Sindhurani P (2010) MicroRNA let-7: An emerging next-generation cancer therapeutic. *Curr. Oncol*. 17:70–80.
- Baselga J., Swain S.M (2009) Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat. Rev. Cancer*. 9:463–475.
- Bhattacharya A, Deng JM, Zhang Z, Behringer R, de Crombrughe B, Maity SN (2003) The B subunit of the CCAAT box binding transcription factor complex (CBF/NF-Y) is essential for early mouse development and cell proliferation. *Cancer Res*. 63:8167-72.
- Becker JC (2014) Tumor-educated myeloid cells: impact the micro- and macroenvironment. *Exp Dermatol*. 23:157-8.
- Bocchinfuso, WP (2000) Induction of mammary gland development in estrogen receptor- α knockout mice. *Endocrinology*. 141:2982–2994
- Boggio K, Nicoletti G, Di Carlo E, Cavallo F, Landuzzi L, *et al.*, (1998) Interleukin 12-mediated prevention of spontaneous mammary adenocarcinomas in two lines of Her-2/neu transgenic mice. *J Exp Med*. 188:589-96.
- Borchert GM, Lanier W, Davidson BL (2006) RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*. 13:1097-101
- Boyerinas B, Park SM, Hau A, Murmann AE, Peter ME. (2010) The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocr Relat Cancer*. 17(1):F19-36.
- Büssing I, Slack FJ, Grosshans H (2008) let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer. *Trends Mol Med*. 14:400-9.

- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, *et al.*, (2004) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2999-3004
- Careccia S, Mainardi S, Pelosi A, Gurtner A, Diverio D, *et al.*, (2009) A restricted signature of miRNAs distinguishes APL blasts from normal promyelocytes. *Oncogene*. 28:4034-40.
- Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, *et al.*, (2006) Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 295:2492-2502.
- Chang SS, Jiang WW, Smith I, Poeta LM, Begum S, *et al.*, (2008) MicroRNA alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 123:2791-7.
- Cheon DJ, Orsulic S (2011) Mouse models of cancer. *Annual review of pathology*. 6:95–119.
- Christodoulatos GS, Dalamaga M. (2014) Micro-RNAs as clinical biomarkers and therapeutic targets in breast cancer: Quo vadis? *World J Clin Oncol*. 5:71-81.
- Citri A, Yarden Y (2006) EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7:505-16. Review.
- Colditz GA, Kaphingst KA, Hankinson SE, Rosner B. (2012) Family history and risk of breast cancer: nurses' health study. *Breast Cancer Res Treat*. 133:1097-1104.
- Corcoran DL, Pandit KV, Gordon B, Bhattacharjee A, Kaminski N, Benos PV. (2009) Features of mammalian microRNA promoters emerge from polymerase II chromatin immunoprecipitation data. *PLoS* 4:e5279.
- Creighton CJ. (2012) The molecular profile of luminal B breast-cancer. *Biologics*. 6:289-297
- Criscitiello C, Azim HA, Schouten PC, Linn SC, Sotiriou C (2012) Understanding the biology of triple-negative breast cancer. *Ann Oncol*. 23(6):13-18.
- Croce CM, (2009) Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet*. 10:704-14.
- Croce CM, (2013) MicroRNA dysregulation in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 31:2065-6.
- Dangi-Garimella S, Yun J, Eves EM, Newman M, Erkeland SJ, *et al.*, (2009) Raf kinase inhibitory protein suppresses a metastasis signalling cascade involving LIN28 and let-7. *Embo. J*. 28:347–358

- DeRose YS, Wang G, Lin YC, Bernard PS, Buys SS, *et al.*, (2011) Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes. *Nat Med.* 17:1514–1520.
- Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z (2010) Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Developmental cell.* 18:884–901.
- Elkon R, Linhart C, Sharan R, Shamir R, Shiloh Y (2003) Genome-Wide In Silico Identification of Transcriptional Regulators Controlling the Cell Cycle in Human Cells. *Genome Res.* 13:773–780.
- Eroles P, Bosch A, Pérez-Fidalgo JA, Lluch A (2012) Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev.* 38:698–707.
- Förster C, Mäkela S, Wärri A, Kietz S, Becker D, *et al.*, (2002) Involvement of estrogen receptor beta in terminal differentiation of mammary gland epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(24):15578-83.
- Fowler KJ, Walker F, Alexander W, Hibbs ML, Nice EC, *et al.*, (1995) A mutation in the epidermal growth factor receptor in waved-2 mice has a profound effect on receptor biochemistry that results in impaired lactation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:1465-9.
- Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. (2012) Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol.* 12:253-68 Review.
- Goeman F, Manni I, Artuso S, Ramachandran B, Toietta G, *et al.*, (2012) Molecular imaging of nuclear factor- κ B transcriptional activity maps proliferation sites in live animals. *Mol Biol Cell.* 23:1467-74
- Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart- Gebhart M, *et al.*, (2013) Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. *Ann Oncol.* 24:2206-2223
- Guarneri V, Conte P. (2009) Metastatic breast cancer: therapeutic options according to molecular subtypes and prior adjuvant therapy. *Oncologist.* 14:645-656.
- Guled M, Lahti L, Lindholm PM, Salmenkivi K, Bagwan I, *et al.*, (2009) CDKN2A, NF2, and JUN are dysregulated among other genes by miRNAs in malignant mesothelioma -A miRNA microarray analysis. *Genes Chromosomes Cancer.* 48:615-23.
- Guo X., Wu Y., Hartley R.S (2009) MicroRNA-125a represses cell growth by targeting HuR in breast cancer. *RNA Biol.* 6:575–583.

- Gurtner A, Manni I, Fuschi P, Mantovani R, Guadagni F, *et al.*, (2003) Requirement for down-regulation of the CCAAT-binding activity of the NF-Y transcription factor during skeletal muscle differentiation. *Mol Biol Cell*. 14:2706-15.
- Hagan S, Al-Mulla F, Mallon E, Oien K, Ferrier R, *et al.*, (2005) Reduction of Raf-1 kinase inhibitor protein expression correlates with breast cancer metastasis. *Clin. Cancer Res*. 11:7392–7397
- Hartmann LC, Sellers TA, Frost MH, Lingle WL, Degnim AC, *et al.*, (2005). Benign breast disease and the risk of breast cancer. *N Engl J Med*. 353:229-237
- Heitz F, Harter P, Lueck HJ, Fissler-Eckhoff A, Lorenz-Salehi F, *et al.*, (2009) Triple-negative and HER2-overexpressing breast cancers exhibit an elevated risk and an earlier occurrence of cerebral metastases. *Eur J Cancer*. 45:2792-2798
- Hennighausen, Robinson GW. (2005) Information networks in the mammary gland. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6:715-25.
- Hu M, Yao J, Carroll DK, Weremowicz S, Chen H, *et al.*, (2008) Regulation of in situ to invasive breast carcinoma transition. *Cancer Cell* 13:394-406.
- Hu Y, Zhu Q, Tang L (2014). MiR-99a antitumor activity in human breast cancer cells through targeting of mTOR expression. *PLoS One*. 9: e92099.
- Jiang J., Lee E.J., Gusev Y., Schmittgen T.D (2005) Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. *Nucleic Acids Res*. 33:5394–5403.
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, *et al.*, (2005) RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 120:635-47.
- Johnson CD, Esquela-Kerscher A, Stefani G, Byrom M, Kelnar K, *et al.*, (2007) The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. 67:7713-22.
- Jones, F. E. & Stern, D. F (1999) Expression of dominant-negative ErbB2 in the mammary gland of transgenic mice reveals a role in lobuloalveolar development and lactation. *Oncogene*. 18:3481–3490.
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Kurisu W, Thor A, Chen LC, *et al.*, (1992) ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:5321-5.
- Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MC, Voduc D, Speers CH, Nielsen TO, Gelmon K. (2010) Metastatic behaviour of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. 28:3271-3277.

- Kumar M, Ahmad T, Sharma A, Mabalirajan U, Kulshreshtha A *et al.*, (2011) Let-7 microRNA-mediated regulation of IL-13 and allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 128:1077-85
- Kuznetsov HS, Marsh T, Markens BA, Castaño Z, Greene-Colozzi A, *et al.*, (2012) Identification of luminal breast cancers that establish a tumor-supportive macroenvironment defined by proangiogenic platelets and bone marrow-derived cells. *Cancer Discov.* 2:1150-65
- Le Quesne J, Caldas C. (2010) Micro-RNAs and breast cancer. *Mol Oncol.* 4:230-41.
- Lee EJ, Baek M, Gusev Y, Brackett DJ, Nuovo GJ, Schmittgen TD (2008) Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors. *RNA.* 14:35-42.
- Lee RC, Ambros V (2001) An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 294:862-4.
- Lee RC, Feinbaum RL, 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, *et al.*, (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425:415-9.
- Leucci E, Cocco M, Onnis A, De Falco G, van Cleef P, Bellan C, *et al.*, (2008) MYC translocation-negative classical Burkitt lymphoma cases: an alternative pathogenetic mechanism involving miRNA deregulation. *J Pathol.* Dec. 216:440-50.
- Li W, Xie L, He X, Li J, Tu K, *et al.*, (2008) Diagnostic and prognostic implications of microRNAs in human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 123:1616–22.
- Lin EY, Jones JG, Li P, Zhu L, Whitney KD *et al.*, (2003) Progression to malignancy in the polyoma middle T oncoprotein mouse breast cancer model provides a reliable model for human diseases. *Am J Pathol.* 163:2113–2126.
- Long W, Wagner KU, Lloyd KC, Binart N, Shillingford JM, *et al.*, (2003) Impaired differentiation and lactational failure of *ErbB4*-deficient mammary glands identify *ERBB4* as an obligate mediator of *STAT5*. *Development.* 130:5257-68.
- Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science.* 303:95-8.
- Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, *et al.*, (1999) Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev.* 9:2266-78.

- Manni I, Caretti G, Artuso S, Gurtner A, Emiliozzi V, *et al.*, (2008) Posttranslational regulation of NF-YA modulates NF-Y transcriptional activity. *Mol Biol Cell*. 19:5203-13.
- Mattie MD, Benz CC, Bowers J, Sensinger K, Wong L, *et al.*, (2006) Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. *Mol Cancer*. 5:24.
- Meshesha MK, Veksler-Lublinsky I, Isakov O, Reichenstein I, Shomron N, *et al.*, (2012) The microRNA Transcriptome of Human Cytomegalovirus (HCMV). *Open Virol* doi: 10.2174/1874357901206010038.
- Meister G, Tuschl T (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*. 431:343-9.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, *et al.*, (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:10513-8.
- MonteysAM, Spengler RM, Wan J, Tecedor L, Lennox KA, Xing Y, Davidson BL. (2010) Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA* 16:495-505.
- Mulac-Jericevic B, Lydon JP, DeMayo FJ, Conneely OM (2003) Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:9744-9.
- Muller WJ, Sinn E, Pattengale PK, Wallace R. & Leder P. (1988) Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. *Cell*. 54:105–115.
- Naderi A, Teschendorff AE, Barbosa-Morais NL, Pinder SE, Green AR, *et al.*, (2007) A gene-expression signature to predict survival in breast cancer across independent data sets. *Oncogene* 26:1507-16.
- Nam EJ, Yoon H, Kim SW, Kim H, Kim YT, *et al.*, (2008) MicroRNA expression profiles in serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res*.14:2690-5.
- O'Day, E., Lal, A. (2010) MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 12:201.
- Oszolak F, Poling LL, Wang Z, Liu H, Liu XS, *et al.*, (2008) Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev*. 22:3172-83.
- Park K, Han S, Kim HJ, Kim J, Shin E. (2006) HER2 status in pure ductal carcinoma in situ and in the intraductal and invasive components of invasive ductal carcinoma

determined by fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *Histopathology*. 48:702–707.

- Pelosi A, Careccia S, Lulli V, Romania P, Marziali G, *et al.*, (2013) *Oncogene*. 32:3648-54.
- Pelosi A, Careccia S, Sagrestani G, Nanni S, Manni I, *et al.*, (2014) Dual promoter usage as regulatory mechanism of let-7c expression in leukemic and solid tumors. *Mol Cancer Res*. 12:878-89.
- Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, *et al.*, (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 406:747–752.
- Peter ME, (2009) Let-7 and miR-200 microRNAs: guardians against pluripotency and cancer progression 8:843-52.
- Pierce JH, Arnstein P, DiMarco E, Artrip J, Kraus MH, *et al.*, (1991) Oncogenic potential of erbB-2 in human mammary epithelial cells. *Oncogene*. 6:1189-94
- Roskoski R Jr. (2014). The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res*. 79:34-74.
- Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, *et al.*, (2003) The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist*. 8:307-25.
- Sadikot RT, Blackwell TS. (2008) Bioluminescence: imaging modality for in vitro and in vivo gene expression. *Methods Mol Biol*. 477:383-94.
- Sampson VB, Rong NH, Han J, Yang Q, Aris V, *et al.*, (2007) MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res*. 67:9762-70.
- Schooneveld E, Wouters MC, Van der Auwera I, Peeters DJ, Wildiers H, *et al.*, (2012) Expression profiling of cancerous and normal breast tissues identifies microRNAs that are differentially expressed in serum from patients with (metastatic) breast cancer and healthy volunteers. *Breast Cancer Res*. 14:R34.
- Schultz J, Lorenz P, Gross G, Ibrahim S, Kunz M. (2008) MicroRNA let-7b targets important cell cycle molecules in malignant melanoma cells and interferes with anchorage-independent growth. *Cell Res*. 18:549-57.
- Scott GK, Goga A, Bhaumik D, Berger CE, Sullivan CS, 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.

- Shah R, Rosso K, Nathanson SD (2014). Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. *World J Clin Oncol.* 5:283-98.
- Sharif S, Moran A, Huson SM, Iddenden R, Shenton A, *et al.*, (2007) Women with neurofibromatosis 1 are at a moderately increased risk of developing breast cancer and should be considered for early screening. *J Med Genet.* 44:481-484.
- Shell S, Park SM, Radjabi AR, Schickel R, Kistner EO, *et al.*, (2007) Let-7 expression defines two differentiation stages of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104:11400–11405.
- Shi XB, Xue L, Yang J, Ma AH, Zhao J, *et al.*, (2007) An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104:19983–19988.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. (2013) Cancer statistics CA Cancer J Clin. 63:11-30.
- Nana-Sinkam SP, Croce CM (2012) Clinical applications for microRNAs in cancer 93:98-104.
- Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, *et al.*, (1989) Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science.* 244:707-12.
- Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, *et al.*, (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:10869-74.
- Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, *et al.*, (2010) Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:10393–10398.
- Stroynowska-Czerwinska A, Fiszler A, Krzyzosiak WJ (2014) The panorama of miRNA-mediated mechanisms in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci.* Epub ahead of print.
- Takamizawa A, Koizumi T, Fujimoto K, Kubo K, Maruyama Y, Kawakami S, Honda T (2004) Primary malignant lymphoma in the posterior mediastinum. *Respiration.* 71:417-20.
- Taketo M, Schroeder AC, Mobraaten LE, Gunning KB, Hanten G, *et al.*, (1991) FVB/N: an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:2065–2069.
- Tan Y, Zhang B, Wu T, Skogerbø G, Zhu X, *et al.*, (2009) Transcriptional inhibition of Hoxd4 expression by miRNA-10a in human breast cancer cells. *BMC Mol Biol.* 10:12.
- Tang J, Ahmad A, Sarkar FH (2012) The role of microRNAs in breast cancer migration, invasion and metastasis. *Int J Mol Sci* 13:13414-37.

- Thompson D, Duedal S, Kirner J, McGuffog L, Last J, *et al.*, (2005) Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers. *J Natl Cancer Inst.* 97:813-822.
- Thompson D, Seal S, Schutte M, McGuffog L, Barfoot R, *et al.*, (2006) A multicenter study of cancer incidence in CHEK2 1100delC mutation carriers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 15:2542-5.
- Thor AD1, Liu S, Edgerton S, Moore D 2nd, Kasowitz KM, *et al.*, (2000). Activation (tyrosine phosphorylation) of ErbB-2 (HER-2/neu): a study of incidence and correlation with outcome in breast cancer. *J Clin Oncol.* 18:3230-9.
- Trang P, Wiggins JF, Daige CL, Cho C, Omotola M, Brown D (2011) Systemic delivery of tumor suppressor microRNA mimics using a neuTral lipid emulsion inhibits lung tumors in mice. *Mol Ther.* 19:1116–22.
- Turcatel G, Rubin N, El-Hashash A, Warburton D. (2012) MIR-99a and MIR-99b modulate TGF-beta induced epithelial to mesenchymal plasticity in normal murine mammary gland cells. *PLoS One.* 7:31032.
- Van Dyke T, Jacks T (2002) Cancer modeling in the modern era: progress and challenges. *Cell.* 108:135–144.
- Van 't Veer LJ1, Dai H, Van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, *et al.*, (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature.* 415:530–536.
- Visone R1, Pallante P, Vecchione A, Cirombella R, Ferracin M, *et al.*, (2007) Specific microRNAs are downregulated in human thyroid anaplastic carcinomas. *Oncogene.* 26:7590–5.
- Wagner KU, McAllister K, Ward T, Davis B, Wiseman R, Hennighausen L. (2001) Spatial and temporal expression of the Cre gene under the control of the MMTV-LTR in different lines of transgenic mice. *Transgenic Res.* 10: 545–553.
- Wirapati P, Sotiriou C, Kunkel S, Farmer P, Pradervand S, *et al.*, (2008) Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. *Breast Cancer Res.* 10:65-69.
- Wong MW, Nordfors C, Mossman D, Pecanpetelovska G, Avery-Kiejda KA, *et al.*, (2011) BRIP1, PALB2, and RAD51C mutation analysis reveals their relative importance as genetic susceptibility factors for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 127:853-859.
- Yamada Y, Mori H (2007) Multistep carcinogenesis of the colon in Apc(Min/+) mouse. *Cancer science.* 2007. 98:6–10.

- Yersal O, Barutca S (2014) Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol.* 5:412–424.
- Yu F1, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, *et al.*, (2007) let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell.* 131:1109–1123.
- Zeng Y, Cullen BR (2006) Recognition and cleavage of primary microRNA transcripts. *Methods Mol Biol.* 342:49-56.
- Zeps N., Bentel JM., Papadimitriou JM, Dawkins HJ (1999) Murine progesterone receptor expression in proliferating mammary epithelial cells during normal pubertal development and adult estrous cycle. Association with ERa and ERb status. *J. Histochem. Cytochem.* 47:1323–1330.
- Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA (2006) Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact. *Dev Biol.* 289:3-16.
- Zhang BH, Pan XP, Wang QL, Cobb GP, Anderson TA (2005) Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis. *Cell Res.* 15:336-60.
- Zhang Y, Gao JS, Tang X, Tucker LD, Quesenberry P, *et al.*, (2009) MicroRNA 125a and its regulation of the p53 tumor suppressor gene. *FEBS.* 583:3725–3730.
- Zhao Y, Deng C, Lu W, Xiao J, Ma D, Guo *et al.*, (2011) let-7 microRNAs induce tamoxifen sensitivity by downregulation of estrogen receptor alpha signaling in breast cancer. *Mol. Med.* 17:1233–1241.
- Zhong X, Coukos G, Zhang L. (2012) miRNAs in human cancer. *Methods Mol Biol.* 822:295-306.

Grazie

A chi fa sempre il tifo per me.....Alfredo e Bibi.
A chi mi ha creato e sostenuto sempre.....Mamma e Papa'
A chi mi insegna l'entusiasmo della conoscenza.....Giulia

Dedicato

A chi ha combattuto per esserci ma non ce l'ha
fatta.....MAMMA sei in tutto quello che c'è in me!!!