



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO
Dipartimento di Farmacia

Dottorato di ricerca
in **Biologia dei Sistemi**

Ciclo XIV — Anno di discussione 2016

Coordinatore: Chiar.ma Prof.ssa **Antonietta Leone**

***Studio dei meccanismi molecolari alla
base dell'azione dei microRNA in
processi patologici***

Settore scientifico disciplinare di afferenza: **BIO/10**

Dottorando

Dott.ssa
Giuseppina Bruno

Tutore

Chiar.ma Prof.ssa
Carla Esposito

Co-tutore

Chiar.mo Prof.
Alessandro Weisz

Abstract

Abstract	1
----------------	---

Sommario

Sommario	2
----------------	---

Capitolo I. Meccanismi di regolazione genica mediati dai microRNA
--

1.1 microRNA ed altri <i>small non-coding</i> RNA nella regolazione dell'espressione genica.....	4
1.2 Biogenesi e meccanismi d'azione dei miRNA.....	6
1.3 Ruolo dei microRNA nelle patologie umane.....	10
1.3.1 I microRNA nei disordini cardiovascolari.....	10
1.3.2 Ruolo dei microRNA e di altri <i>small non-coding</i> RNA nel cancro.....	11

Capitolo II. Studio dei miRNA nell'attivazione piastrinica

2.1 Introduzione.....	14
2.1.1 Piastrine e fisiopatologia dell'attivazione piastrinica.....	14
2.1.2 miRNA e piastrine.....	18
2.2 Scopo del lavoro.....	19
2.3 Risultati e discussione.....	20
2.3.1 Effetti dell'attivazione sul profilo di espressione degli mRNA piastrinici.....	20
2.3.2 Analisi quantitative del proteoma piastrinico dopo attivazione.....	21
2.3.3 Effetti dell'attivazione sul miRNoma piastrinico.....	24

Capitolo III. Identificazione dei miRNA e dei sncRNA coinvolti nella carcinogenesi endometriale
--

3.1 Introduzione.....	29
3.1.1 Il carcinoma endometriale.....	29
3.2 Scopo del lavoro.....	30
3.3 Risultati e discussione.....	30
3.3.1 Caratterizzazione del profilo di espressione dei miRNA e dei sncRNA in tessuti di endometrio normali, iperplastici e tumorali.....	30
3.3.2 Identificazione di 7 nuovi potenziali miRNA.....	33
3.3.3 Identificazione dei sncRNA coinvolti nella trasformazione neoplastica endometriale.....	33
3.3.4 Analisi funzionale dei <i>pathway</i> cellulari influenzati dai sncRNA coinvolti nella carcinogenesi endometriale.....	35

Capitolo IV. Studio dei meccanismi di regolazione mediati dal recettore degli estrogeni β costitutivo in cellule di carcinoma mammario

4.1 Introduzione.....	39
4.1.1 Carcinoma mammario, estrogeni e recettori degli estrogeni.....	39
4.1.2 Ruolo del recettore degli estrogeni β nel carcinoma mammario.....	42
4.2 Scopo del lavoro	43
4.3 Risultati e discussione.....	43
4.3.1 Effetti dell'attività di RE β costitutivo sull'espressione genica.....	43
4.3.2 Identificazione dei miRNA modulati da RE β costitutivo.....	47
4.3.3 Ruolo del complesso RE β /AGO2 in meccanismi di regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica mediati da miRNA	48

Capitolo V. Conclusioni

5.1 Conclusioni	56
-----------------------	----

Capitolo VI. Materiali e Metodi

6.1 Prelievo, purificazione ed attivazione piastrinica	58
6.2 Selezione e prelievo dei tessuti endometriali	58
6.3 Linee cellulari e condizioni di coltura.....	59
6.4 Estrazione di RNA, RNA-Seq, <i>small</i> RNA-Seq e analisi dati	59
6.5 Microarray e analisi dati.....	60
6.6 Immunoprecipitazione della cromatina, sequenziamento e analisi dati	61
6.7 Estrazioni proteiche, co-immunoprecipitazione e western blot	62
6.8 Proteomica quantitativa e analisi dati	62
6.9 Proximity Ligation Assay	63
6.10 Immunoprecipitazione del RNA, sequenziamento e analisi dati	63
6.11 Gene ontology e analisi funzionali.....	63

Bibliografia

Bibliografia.....	I-XI
-------------------	------

Ringraziamenti

Ringraziamenti

Abstract

My research project concerns the study of the molecular mechanisms involving microRNAs (miRNAs) in pathological processes such as tumors and cardiovascular diseases. miRNAs are small non-coding RNAs (sncRNAs) acting by modulating post-transcriptionally gene expression of specific mRNA target. Many studies have shown that the aberrant expression of these sncRNA is closely correlated with the onset of many diseases, including cancer and occlusive cardiovascular syndromes.

Therefore, the study was conducted on three different experimental models such as activated platelets *in vitro*, tumor tissues of endometrial cancer (EC) and breast cancer (BC) cells expressing the estrogen receptor β (ER β).

Platelet activation is involved not only in physiological processes as haemostasis but also in the thrombogenesis and the pathogenesis of occlusive cardiovascular disorders including Acute Coronary Syndromes (ACS). However, the several events of resistance to antithrombotic therapies suggest the existence of mechanisms, at the basis of the activation process, still not known. The data that I obtained, following *ex vivo* activation of platelets from healthy donors, demonstrated the existence of miRNA *pathway* maturation in platelets and a significant reorganization of platelet proteome mediated by miRNAs upon activation.

EC is one of the most frequent types of cancer affecting the female population and develops, in most of cases, from an hyperplastic condition.

I identified changes in the expression of miRNAs and other sncRNAs from paired normal, hyperplastic and cancerous endometrial tissues obtained by hysteroscopy. The results obtained allowed me to define a signature of sncRNAs deregulated in neoplastic transformation, characterized by 129 miRNAs, 10 piRNAs (PIWI-interacting RNAs) and 3 snoRNAs (small nucleolar RNAs).

Moreover, *in silico* analysis of downstream targets revealed that these endometrial sncRNAs are involved in several cellular processes and canonical pathways, including TGF- β , ERK/MAPK and Wnt/ β -catenin signaling pathways.

In 70% of the cases BC is a hormone-responsive tumor since cells are able to respond to proliferative stimuli induced by estrogens thanks to estrogen receptors (ERs). Recent studies have shown that unliganded-ER β is equally distributed between the nucleus and cytoplasm and that its presence determines a reduction of cell growth. In this study, by applying gene expression profiling and *in vivo* global mapping of ER β binding site to genome, I have demonstrated that the receptor is able to regulate gene expression at transcriptional level also in the absence of ligand.

The results obtained from smallRNA-seq experiments revealed that miRNAs expression profile is influenced by constitutive-ER β activity in MCF-7 BC cells. Proteomic analysis of molecular partners of unliganded ER β showed an association with Argonaute 2 (AGO2). RNA immunoprecipitation coupled to massive parallel sequencing (RIP-Seq) experiments revealed that ER β -AGO2/miRNA complex is able to bind and regulate at post-transcriptional level specific mRNAs involved in several biological pathways in BC cells deprived of hormonal stimuli.

Sommario

Il progetto di ricerca che ho svolto durante il Dottorato è stato focalizzato sullo studio dei meccanismi molecolari alla base dell'azione dei microRNA (miRNA) in diversi processi patologici, ed in particolare nel cancro e nei disordini cardiovascolari occlusivi. I miRNA sono piccoli RNA non codificanti in grado di regolare negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale mediante il legame con la regione 3'UTR (UnTranslated Region) di mRNA bersaglio, in modo da determinarne la degradazione o un blocco della traduzione in proteina. Numerosi sono gli studi in cui è dimostrato che un alterato profilo di espressione di questi sncRNA correla con l'insorgenza e/o la progressione di differenti patologie, comprese malattie neurodegenerative, disordini del sistema cardiovascolare e cancro.

Lo studio è stato condotto su tre diversi modelli sperimentali quali piastrine attivate *in vitro*, biopsie di tumore dell'endometrio e linee cellulari di carcinoma mammario esprimenti il recettore degli estrogeni β (RE β).

L'attivazione piastrinica ha un ruolo cruciale non solo in processi fisiologici come l'emostasi e la coagulazione ma anche nella trombogenesi e nella patogenesi di disordini occlusivi che colpiscono il sistema circolatorio. I frequenti eventi di resistenza alle terapie anti-trombotiche suggeriscono l'esistenza di meccanismi alla base di tale processo non ancora noti, da qui la necessità di compiere ulteriori studi a riguardo. I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'attivazione indotta *in vitro* determina una riorganizzazione del proteoma piastrinico che riflette cambiamenti del profilo di espressione dei miRNA; tali proteine modulate sono coinvolte nella risposta immunitaria, nell'infiammazione e nella cascata coagulativa.

Il carcinoma endometriale (CE) rappresenta una delle forme di cancro che maggiormente colpisce la popolazione femminile nei Paesi industrializzati e al quale è ancora legato un tasso di mortalità elevato. Nel 75% dei casi si tratta di adenocarcinoma endometriale di tipo I che si sviluppa a partire da uno stato patologico iperplastico (stadio di pre-cancerosi). Mediante esperimenti di sequenziamento dei sncRNA eseguiti su tessuti di endometrio sano, iperplastico e tumorale, è stato caratterizzato un gruppo di 142 sncRNA coinvolti nel processo tumorigenico. Analisi funzionali hanno, inoltre, rivelato che tali sncRNA sono coinvolti in numerosi *pathway* cellulari, incluse le vie di segnalazione intracellulari di TGF- β , ERK/MAPK e Wnt- β catenina.

Il carcinoma mammario (CM) nel 70% dei casi risulta essere un tumore ormono-responsivo in quanto le cellule rispondono agli stimoli proliferativi indotti dagli estrogeni grazie alla presenza di specifici recettori che funzionano da fattori di trascrizione, i recettori degli estrogeni (RE). Recenti studi hanno dimostrato che RE β in assenza di stimolo ormonale è equidistribuito tra nucleo e citosol e che è in grado di agire come soppressore tumorale inibendo la crescita cellulare. Partendo da tali evidenze, sono stati condotti studi del profilo di espressione genica e di mappatura globale *in vivo* dei siti di legame costituiti del recettore al genoma di cellule MCF-7. Mediante sequenziamento dei miRNA è stato anche dimostrato che RE β modula l'espressione di miRNA notoriamente espressi a bassi livelli in molti tipi di tumore, compreso let-7d e miR-125a.

Studi di proteomica condotti nell'ambito di altre attività di ricerca del Laboratorio di Medicina Molecolare e Genomica, presso il quale ho svolto il mio periodo di Dottorato, hanno identificato gli interattori molecolari di RE β costitutivo, tra cui la proteina Argonauta 2 (AGO2).

Mediante immunoprecipitazione del RNA accoppiata a sequenziamento massivo parallelo (RIP-Seq) è stato possibile identificare sia i miRNA sia i trascritti esclusivamente legati dal recettore in associazione con AGO2. Tra i *target* putativi dei miRNA immunoprecipitati rientra la maggior parte degli mRNA legati dal complesso RE β /AGO2, per i quali è stato dimostrato il coinvolgimento in numerose funzioni biologiche, compreso ciclo cellulare, proliferazione e differenziamento cellulare, oltre che sviluppo e funzionalità del sistema riproduttivo.

1.1 microRNA ed altri *small non-coding* RNA nella regolazione dell'espressione genica

Per espressione genica si intende l'insieme dei processi attraverso cui l'informazione contenuta in un gene viene convertita in macromolecole funzionali come le proteine. La regolazione dell'espressione genica permette alla cellula di differenziarsi, di svolgere le sue funzioni basali e di modificarle in determinate condizioni e/o in risposta a specifici stimoli. Sistemi interni alla cellula, sempre più sofisticati e complessi lungo la scala evolutiva, assicurano il controllo dell'espressione genica a vari livelli, dalla trascrizione al processamento del mRNA fino alla traduzione e la corretta compartimentalizzazione ed attività della proteina sintetizzata.

Diversi studi hanno dimostrato l'esistenza di meccanismi di regolazione dell'espressione genica mediati da molecole di RNA non codificante (*non-coding* RNA, ncRNA), fino a qualche decennio fa considerate unicamente "junk DNA", fatta eccezione per l'RNA ribosomiale (rRNA) e l'RNA *transfer* (tRNA). Sebbene circa l'80% del genoma sia trascritto in RNA, infatti, solo l'1-2% di esso è tradotto in proteina, generando un elevato numero di ncRNA che sono attivamente coinvolti nella modulazione genica ed epigenetica (Carninci *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2005; Derrien *et al.*, 2012; Djebali *et al.*, 2012; Wahlestedt *et al.*, 2013). I ncRNA, in base alla lunghezza dei trascritti, possono essere suddivisi in due principali classi: una prima classe definita *small non-coding RNA* (sncRNA) che comprende microRNA (miRNA), RNA associati alle proteine PIWI (piRNA), piccoli RNA nucleolari (snoRNA) e *small interfering* RNA (siRNA); la seconda classe è quella dei *long non-coding RNA* (lncRNA), nella quale sono inclusi i *long intergenic non-coding RNA* e trascritti antisenso (fig.1).

I miRNA sono piccoli RNA non codificanti (18-25 nucleotidi), in grado di regolare negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale; essi, infatti, legando la regione 3'-UTR (*UnTranslated Region*) di un mRNA bersaglio, possono favorirne la degradazione mediante un aumento della velocità di deadenilazione oppure inibirne la traduzione in proteina (Bartel *et al.*, 2004). In entrambi i casi si ha il silenziamento del gene, il cui effetto è la mancata produzione della proteina corrispondente. Si tratta di piccoli RNA antisenso che legano il messaggero bersaglio per complementarità di basi; nei mammiferi, tale complementarità nella maggior parte dei casi risulta parziale e determina un blocco della traduzione mentre la totale complementarità si verifica solo raramente e induce degradazione del trascritto.

Da un punto di vista funzionale è stato dimostrato che un singolo miRNA è in grado di regolare l'espressione di diversi geni e che un determinato gene può essere regolato da miRNA differenti che agiscono in maniera sinergica tra loro.

Lo sviluppo di tecnologie di sequenziamento *high-throughput* di nuova generazione ha permesso, sia di identificare i geni miRNA conservati tra le diverse specie, sia di studiare la distribuzione dei miRNA nel regno animale. I risultati ottenuti hanno rivelato l'esistenza di una diretta correlazione tra il numero dei piccoli RNA non codificanti e la complessità morfologica, suggerendo che la comparsa dei geni miRNA sia stato un fattore importante nell'evoluzione degli organismi complessi (Heimberg *et al.*, 2008).

La regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica mediata dai miRNA influenza numerosi processi fisiologici quali apoptosi, ciclo cellulare, proliferazione e differenziamento cellulare, sviluppo embrionale, ematopoiesi ed adipogenesi, ed è noto che alterazioni del profilo di espressione dei miRNA sono strettamente correlate

all'insorgenza e/o alla progressione di patologie quali morbo di *Alzheimer*, Sindrome dell'X fragile, molti tipi di cancro e malattie cardiovascolari (Singh *et al.*, 2008; Garzon *et al.*, 2009).

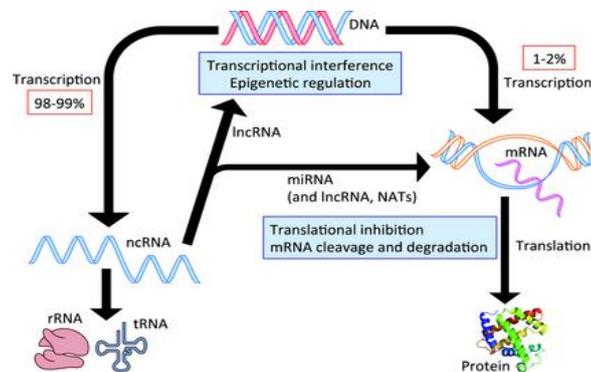


Figura 1. Non-coding RNA e regolazione dell'espressione genica. Rappresentazione schematica dei principali ncRNA e dei meccanismi di regolazione genica in cui sono coinvolti (da *Maegdefessel*, 2014).

Nonostante i miRNA siano convenzionalmente coinvolti nei meccanismi di regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica che avvengono nel compartimento citoplasmatico, recenti studi hanno dimostrato la loro presenza anche all'interno del nucleo di cellule umane, dove possono funzionare sia da attivatori che inibitori trascrizionali di geni bersaglio. I miRNA processati e maturati nel citosol, insieme ai fattori RNAi (*RNA-interference*) ad essi associati, sono importati nel nucleo grazie a specifiche proteine appartenenti alla famiglia delle carioferine ovvero Esportina-1 (XPO1) ed Importina-8 (IPO8) (Castanotto *et al.*, 2009; Weinmann *et al.*, 2009). Una volta nel nucleo i miRNA agiscono regolando la stabilità dei trascritti nucleari, inducendo alterazioni epigenetiche a livello dei promotori di specifici geni che determinano attivazione o silenziamento trascrizionale e modulando, infine, eventi di *splicing* alternativo co-trascrizionale (Roberts *et al.*, 2014).

I piRNA sono sncRNA lunghi 24-32 nucleotidi che interagiscono con le proteine PIWI (*P-element induced wimpy testis*) appartenenti alla superfamiglia delle proteine Argonauta (AGO) ed espresse preferenzialmente nella linea germinale. I piRNA sono espressi nei testicoli e sono coinvolti nella spermatogenesi attraverso la regolazione della meiosi e/o soppressione dei trasposoni (Aravin *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2006). I piRNA e le proteine PIWI ad essi associate, infatti, assicurano il mantenimento dell'integrità del genoma contro l'attività degli elementi trasponibili, ovvero quelle sequenze di DNA capaci di trasportare sé stesse all'interno di nuove posizioni nel genoma. Nei mammiferi sono stati identificati centinaia di piRNA differenti, con nessun motivo di struttura preferenziale ma tutti con un'uridina comune al 5'. All'estremità 3' i piRNA presentano una 2'-O-metilazione, una modificazione che li protegge dall'attività esonucleasica 3'→5' e ne aumenta la stabilità (Kirino *et al.*, 2007).

I piRNA non sono distribuiti lungo l'intero genoma, ma sono raggruppati in poche centinaia di *loci* genomici chiamati piRNA *clusters* e a differenza delle altre classi di

ncRNA sono generati da un precursore di RNA a singolo filamento mediante un meccanismo indipendentemente dall'RNasi di tipo III *Dicer* (Vagin *et al.*, 2006). Recenti studi hanno messo in evidenza che l'espressione delle proteine PIWI e dei piRNA non è tuttavia limitata alla linea germinale ma risulta estesa anche alle cellule somatiche. Rizzo *et al.*, ad esempio, hanno studiato il ruolo dei piRNA nella rigenerazione epatica e i risultati ottenuti suggeriscono che essi possono funzionare controllando la crescita di cellule di fegato (Rizzo *et al.*, 2014).

Gli snoRNA sono molecole di RNA non codificante della lunghezza di 60-300 nucleotidi, in grado di favorire alcune modificazioni chimiche del rRNA (soprattutto metilazione e pseudouridilazione) che aumentano l'attività del RNA maturo. Essi possono essere suddivisi in due classi, caratterizzate da diversi elementi di sequenza conservati evolutivamente: la classe box C/D guida la metilazione al 2'-O-ribosio mentre la classe box H/ACA la pseudouridilazione di RNA *target* (Dieci *et al.*, 2009). Gli snoRNA compongono e guidano le *small nucleolar ribonucleoprotein* (piccole ribonucleoproteine nucleolari o snoRNP) presso l'esatto sito di modificazione del RNA bersaglio appaiandosi ad esso e consentendo alla componente proteica di tale complesso di catalizzare la modifica chimica a carico del RNA bersaglio. Inizialmente si pensava che il ruolo degli snoRNA fosse limitato alla modifica del rRNA durante la biogenesi dei ribosomi all'interno dei nucleoli, tuttavia è stato dimostrato che essi possono legare anche altri RNA come mRNA e *small nuclear RNA* (snRNA).

Alla luce di tali evidenze sperimentali, tuttavia, ulteriori studi sono necessari affinché vengano chiariti i meccanismi con cui i miRNA e gli altri sncRNA regolano l'espressione genica e la maggior parte dei processi cellulari. Risulta chiaro che le funzioni da essi svolte dipendano essenzialmente da quelle dei loro bersagli e pertanto anche la ricerca di questi ultimi è di fondamentale importanza per comprendere gli effetti della regolazione genica mediata dai piccoli RNA non-codificanti sia a livello trascrizionale che post-trascrizionale.

1.2 Biogenesi e meccanismi d'azione dei microRNA

La biogenesi dei miRNA si articola in tre fasi: trascrizione e processamento nel nucleo, traslocazione nucleo-citosol e maturazione nel citoplasma (fig.2).

La trascrizione dei miRNA è mediata dalla RNA Polimerasi II o III, la quale si lega a geni che possono essere localizzati nel genoma singolarmente ed essere controllati da un proprio promotore o essere organizzati in gruppi (*cluster*) sotto il controllo di un unico promotore con formazione di trascritti policistronici (Rodriguez *et al.*, 2009).

I trascritti primari vengono definiti pri-miRNA e sono caratterizzati da una struttura secondaria con conformazione "a forcina" e a livello della quale l'RNA è a doppio filamento. Successivamente i pri-miRNA grazie all'azione del complesso microprocessore costituito dall'RNasi III *Drosha* e dal cofattore DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*) vengono processati in pre-miRNA, sequenze a doppio filamento della lunghezza di circa 60-70 nucleotidi caratterizzati anch'essi da una struttura a forcina. Il processamento dei pri-miRNA può richiedere l'intervento di altri fattori che cooperano con *Drosha* come p68, p72, SMAD e la ribonucleoproteina hnRNPA1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1) mentre talvolta può non dipendere da *Drosha* come nel caso dei miRtroni, ovvero miRNA la cui sequenza

genica è localizzata negli introni di geni ospiti codificanti per mRNA e processati in pre-miRNA dallo spliceosoma (Fukuda *et al.*, 2007; Guil *et al.*, 2007; Michlewski *et al.*, 2008; Davis *et al.*, 2008).

I pre-miRNA grazie ad una Ran GTPasi, l'esportina 5, vengono esportati dal nucleo al citoplasma. Qui legano un'altra RNasi di tipo III, *Dicer*, che insieme alla proteina TRBP (*HIV transactivating response RNA-binding protein*) taglia la struttura a forcina generando una molecola a doppio filamento di RNA di 20-25 paia di basi che contiene il miRNA maturo (filamento guida) ed il suo complementare miRNA* (Starega-Roslan *et al.*, 2011). Questo duplex miRNA/miRNA* è incorporato nel complesso multiproteico RISC (*RNA induced-silencing complex*) all'interno del quale avviene l'interazione tra il miRNA maturo e l'mRNA bersaglio e il cui centro catalitico è rappresentato dalla proteina AGO2.

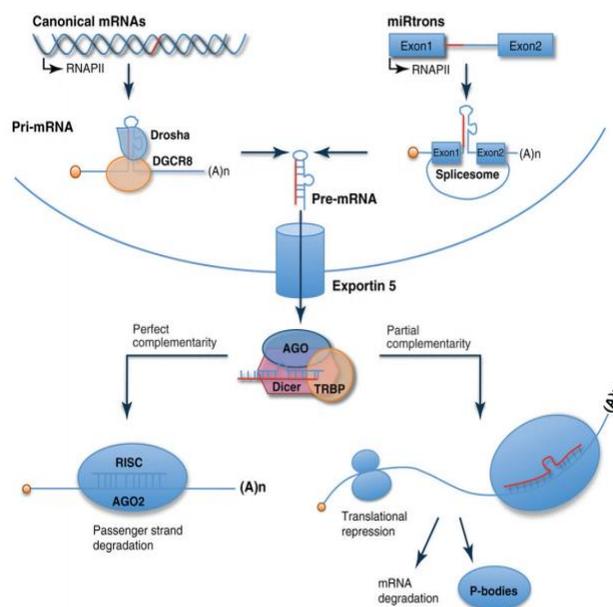


Figura 2. Biogenesi dei miRNA. Rappresentazione schematica delle fasi di maturazione dei miRNA (modificata da Chang and Hla, 2011).

Le proteine Argonata sono una famiglia di proteine evolutivamente conservate, presenti in quasi tutti gli eucarioti, in alcuni batteri ed archeobatteri. Negli esseri umani, sono state identificate otto proteine Argonata uniformemente distribuite su due cladi, la clade AGO (AGO1-4) e la clade PIWI (PIWIL1-4) (Yigit *et al.*, 2006).

In questo studio maggiore interesse è stato rivolto alla proteina AGO2.

AGO2 ha un peso molecolare di circa 100 kDa ed è caratterizzata dalla presenza di tre domini funzionali (fig. 3):

- 1) il dominio PAZ (*Piwi-Argonaute-Zwille*) all'estremità N-terminale, coinvolto nel legame all'estremità 3' del miRNA maturo grazie ad una specifica tasca di legame;

- 2) l'interfaccia tra il dominio centrale MID (*Middle*) e il dominio PIWI al C-terminale, responsabile del legame all'estremità 5' del sncRNA attraverso una stabile interazione mediata da una tirosina conservata e numerosi legami ad idrogeno;
- 3) il dominio PIWI, ritenuto possa essere responsabile della degradazione dei mRNA bersaglio perchè caratterizzato da una conformazione simile al dominio funzionale della RNasi-H, un'endonucleasi responsabile del taglio al RNA.

Nel corso dell'evoluzione sostituzioni amminoacidiche nel dominio PIWI hanno contribuito a rendere il sito catalitico degenerato e ciò ha comportato l'acquisizione di nuove funzioni quali la capacità di compiere un taglio endonucleasico dipendente dall'ibrido RNA-RNA per AGO2 e alla perdita dell'attività catalitica per le restanti AGO umane (AGO1,3 e 4) (Kim *et al.*, 2009).

La presenza di *mismatch* nelle posizioni 2-8-12-16 del filamento guida favorisce l'attività endonucleolitica di AGO2 che digerisce il miRNA* termodinamicamente più instabile (Kim *et al.*, 2012).

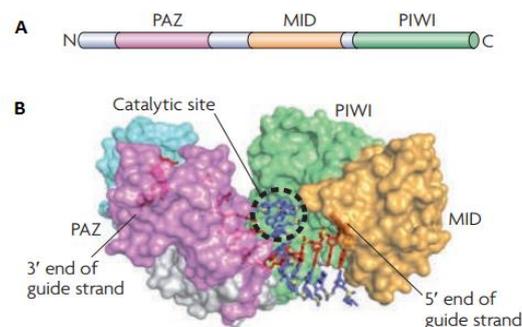


Figura 3. Rappresentazione dei domini funzionali di una proteina AGO2. **A)** Schematizzazione dei domini PAZ, MID e PIWI. **B)** Domini funzionali nella struttura tridimensionale di proteina AGO associata al filamento guida di uno sncRNA (in rosso) e al mRNA target (in blu) (modificata da Kim *et al.*, 2009).

Il complesso costituito dal RISC e dal miRNA maturo si associa per complementarità imperfetta al 3'UTR (*Untranslated region*) dell'mRNA bersaglio, inibendo l'associazione del ribosoma con l'mRNA *target* oppure causando il prematuro distacco del ribosoma, a cui segue il blocco o il rallentamento della sintesi proteica e la degradazione co-traduzionale della proteina. Inoltre sembra che il complesso RISC-miRNA maturo possa avere altri effetti sugli mRNA bersaglio, come la promozione della deadenilazione, che può risultare nella degradazione dell'mRNA all'interno di foci citoplasmatici definiti *P-bodies*, considerati sede di deposito e catabolismo del RNA.

È possibile definire alcune peculiarità della modalità di appaiamento: la regione 5' del miRNA (7-10 nucleotidi) è definita *seed region* e rappresenta la regione che lega il 3'-UTR del mRNA bersaglio, solitamente in maniera perfettamente complementare; a valle della *seed region* è presente un *bulge* o un *loop* mentre la regione 3' del miRNA mostra appaiamento imperfetto con il suo *target* ed è caratterizzata dalla presenza di

numerose coppie U:G, poco comuni invece nella *seed region* perché meno stabili e più reattive rispetto alle coppie canoniche.

In fig.4 sono mostrati i principali meccanismi di silenziamento miRNA-mediati (Eulalio *et al.*, 2008):

- A) l'inibizione della traduzione mediante il distacco prematuro dei ribosomi durante la fase di allungamento;
- B) la proteina nascente è degradata come conseguenza di un blocco della traduzione;
- C) il dominio centrale di AGO2 ha elevata analogia con il fattore di inizio della traduzione EIF4E, e quindi lo sostituisce nel legame al cappuccio di 7-metilguanosa;
- D) AGO2 recluta un fattore eIF6 che impedisce alle subunità del ribosoma di legarsi;
- E) RISC recluta fattori per la deadenilazione come CCR4-NOT e CAF1 impedendo quindi la formazione di un *loop* chiuso del mRNA che provocherebbe un aumento della traduzione;
- F) la deadenilazione e la successiva rimozione del *capping* provocano una veloce degradazione del mRNA bersaglio.

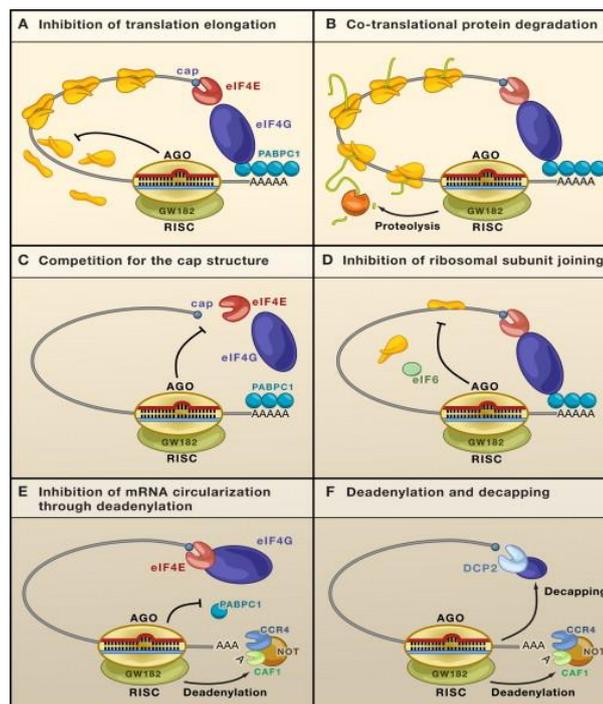


Figura 4. Meccanismi di silenziamento genico post-trascrizionale miRNA-mediati. Sono illustrati i principali meccanismi di inibizione della sintesi proteica operati dai miRNA: **A)** distacco prematuro dei ribosomi; **B)** degradazione co-traduzionale della proteina; **C)** competizione per il legame al cap; **D)** inibizione dell'assemblaggio dei ribosomi; **E)** inibizione della circolarizzazione del mRNA; **F)** deadenilazione e decapping (da Eulalio *et al.*, 2008).

proteina Dyrk-1a (*dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase-1a*) coinvolta nel *signaling* NFAT/calceineurina.

Diversi miRNA sono implicati nella fibrosi cardiaca, compresi miR-21, miR-29, miR-30, miR-133 e miR-590; miR-21, in particolare, regola l'espressione della metalloproteasi-2 di matrice (MMP-2) via PTEN (phosphatase and tensin homologue) nei fibroblasti (Thum *et al.*, 2008) e determina la riduzione di espressione di spry-1 (*sprouty-1*), un inibitore di tirosin chinasi normalmente espresso nei fibroblasti, con conseguente secrezione di FGF (Fattore di crescita dei fibroblasti) e fibrosi interstiziale ed ipertrofia cardiaca (Thum, Gross *et al.*, 2008).

È stato dimostrato che miR-499 ha una funzione protettiva contro l'apoptosi indotta da ischemia/riperfusion, contrariamente a miR-320 che ne induce l'attivazione regolando hsp20 (*heat shock protein 20*) (Wang *et al.*, 2011; Ren *et al.*, 2009).

È noto che i miRNA secreti da alcuni tipi cellulari possono accumularsi nei fluidi biologici come il plasma e, data la loro elevata stabilità rispetto all'azione delle RNasi, essi potrebbero essere usati come specifici biomarcatori per diverse patologie, comprese quelle cardiovascolari. Un aumento dei livelli di miR-423-5p nel plasma è stato rilevato in pazienti affetti da insufficienza cardiaca mentre la concentrazione plasmatica di miR-126, miR-17 e miR-92a si riduce nei disordini coronarici (Fichtlscherer *et al.*, 2010).

I miRNA sono quindi importanti regolatori della fisiologia di cuore e sistema circolatorio e come tali possono rappresentare potenziali bersagli terapeutici per la cura delle malattie cardiovascolari.

1.3.2 Ruolo dei microRNA e di altri *small non-coding RNA* nel cancro

Sebbene studi mirati a determinare le correlazioni tra livelli di espressione dei miRNA e le malattie umane siano ancora necessari, esistono evidenze sperimentali che dimostrano il ruolo cruciale dei miRNA nella patogenesi del cancro. La prima evidenza del coinvolgimento dei miRNA nelle neoplasie è data dalla sottoespressione o delezione di miR-15 e miR-16 nella maggior parte dei pazienti affetti da Leucemia Linfocitica Cronica (CLL) (Cimmino *et al.*, 2005).

Questa scoperta ha dato il via a numerosi studi che hanno rivelato l'espressione differenziale dei miRNA non solo tra tessuto normale e tumorale, ma anche tra tumore primario e metastatico. Queste differenze sono tumore-specifiche ed in alcuni casi associabili alla prognosi. Ad oggi sono tre i meccanismi differenti alla base delle variazioni dei livelli di espressione dei miRNA, come la co-localizzazione di geni codificanti per miRNA e regioni genomiche associate al cancro, la regolazione epigenetica e l'alterata espressione di proteine coinvolte nel processamento e nella biogenesi dei microRNA (Calin *et al.*, 2002).

Più del 50% dei geni che trascrivono per miRNA risiedono in regioni del genoma spesso soggette ad alterazioni (Calin *et al.*, 2004); possono comprendere regioni di LOH (*loss of heterozygosity*, perdita di eterozigosità) che contengono geni oncosoppressori, regioni di amplificazione che potrebbero invece contenere oncogeni, regioni comuni di rottura dei cromosomi e siti fragili (FRA). I FRA sono siti preferenziali di scambio fra cromatidi fratelli, delezioni, amplificazioni, traslocazioni e integrazione di plasmidi a DNA e virus associati al tumore come quello del papilloma umano (HPV).

Per quanto riguarda le modificazioni epigenetiche quali alterata metilazione/acetilazione del DNA, un'estensiva analisi genomica delle sequenze geniche che codificano per i miRNA ha evidenziato che circa il 50% dei *loci* sono associati con isole CpG (Weber *et al.*, 2007), suggerendo che una variazione dello stato di metilazione potrebbe essere responsabile della deregolazione di miRNA nei tumori (Fazi *et al.*, 2007). Anche alterazioni a carico di proteine coinvolte nella biosintesi dei miRNA determinano notevoli conseguenze sulla loro espressione: è stato osservato, infatti, che la mancanza del processamento da parte di *Drosha* potrebbe spiegare la sottoespressione dei miRNA osservata in molti tumori primari (Thomson *et al.*, 2006). Anche la riduzione di *Dicer* nel tumore del fegato è stata associata ad una cattiva prognosi e una ridotta sopravvivenza post-operatoria dei pazienti affetti da tale neoplasia (Harris *et al.*, 2006; Karube *et al.*, 2005), indicando che questo fattore potrebbe essere in grado di prevenirne la trasformazione maligna. Indipendentemente dal meccanismo, l'effetto globale in caso di inattivazione di un miRNA sarà la sovraespressione dei suoi geni bersaglio, mentre la sua attivazione porterà alla sottoespressione dei geni bersaglio. È la funzione svolta dai trascritti bersaglio, quindi, a determinare se un miRNA è da considerarsi oncogene o oncosoppressore.

In generale, vengono considerati oncosoppressori quei miRNA la cui riduzione di espressione rispetto ad una situazione fisiologica causa la sovraespressione del bersaglio molecolare, che in questo caso è un'oncogene direttamente implicato nella trasformazione tumorale. Al contrario i miRNA oncogeni sono il prodotto di mutazioni a carico di proto-oncogeni in grado di inibire specificamente l'espressione di oncosoppressori, impedendo la loro funzione di controllo delle normali attività cellulari e causando l'acquisizione da parte della cellula di una o più caratteristiche neoplastiche (fig.6).

miR-34a ad esempio è un noto soppressore tumorale, i cui livelli di espressione si riducono nelle cellule cancerose di pancreas, mammella, ovaio, colon e polmone a causa di un'alterata regolazione epigenetica. L'espressione di tale miRNA viene infatti recuperata dopo modificazione epigenetica con l'agente demetilante 5-Aza-Dc (5-aza 20 deossicitidina) e l'inibitore dell'enzima deacetilasi SAHA (acido idrossamico suberoylanilide).

Inoltre, recentemente è emersa la correlazione tra miRNA e cellule staminali tumorali (CSC). Esse sono induttori della crescita e dello sviluppo dei tessuti tumorali e sono definite come cellule che hanno la capacità di autoreplicarsi, differenziarsi e di trasformare le cellule normali. I miRNA possono influenzare la differenziazione delle CSC e una loro deregolazione può determinare la produzione di CSC, che porta allo sviluppo del cancro (Huang *et al.*, 2014).

Negli ultimi anni un numero sempre crescente di studi ha messo in evidenza il coinvolgimento dei piRNA e delle proteine PIWI nello sviluppo tumorale (Mei *et al.*, 2013). La relazione tra piRNA e cancerogenesi è stata dimostrata attraverso risultati di analisi condotte mediante screening di *microarray*, sequenziamento di nuova generazione e real time PCR quantitative. Tali risultati dimostrano che i piRNA possono agire come oncogeni ed oncosoppressori nella tumorigenesi attraverso la regolazione della proliferazione e sopravvivenza cellulare e dell'invasività delle cellule cancerose. piR-651, ad esempio, risulta sovra-espresso in molti tipi di cancro, compreso quello dello stomaco, del polmone e della mammella e l'inibizione della sua espressione mediante oligonucleotidi antisense determina l'arresto della

proliferazione e del ciclo cellulare in fase G2/M di cellule tumorali gastriche (Cheng *et al.*, 2011).

Di recente è stato scoperto anche un probabile ruolo degli snoRNA nella tumorigenesi del cancro alla prostata e alla mammella mediante la regolazione del processo di traduzione delle proteine.

Le evidenze sperimentali ottenute nell'ultimo decennio dimostrano quindi che i miRNA e gli altri piccoli RNA non codificanti possono rappresentare dei validi marcatori diagnostici e prognostici dei tumori umani. L'espressione aberrante dei sncRNA nei differenti tipi di tumore è stata infatti correlata con le specifiche caratteristiche bio-patologiche del tumore stesso, con l'esito della malattia e con la risposta ai trattamenti farmacologici.

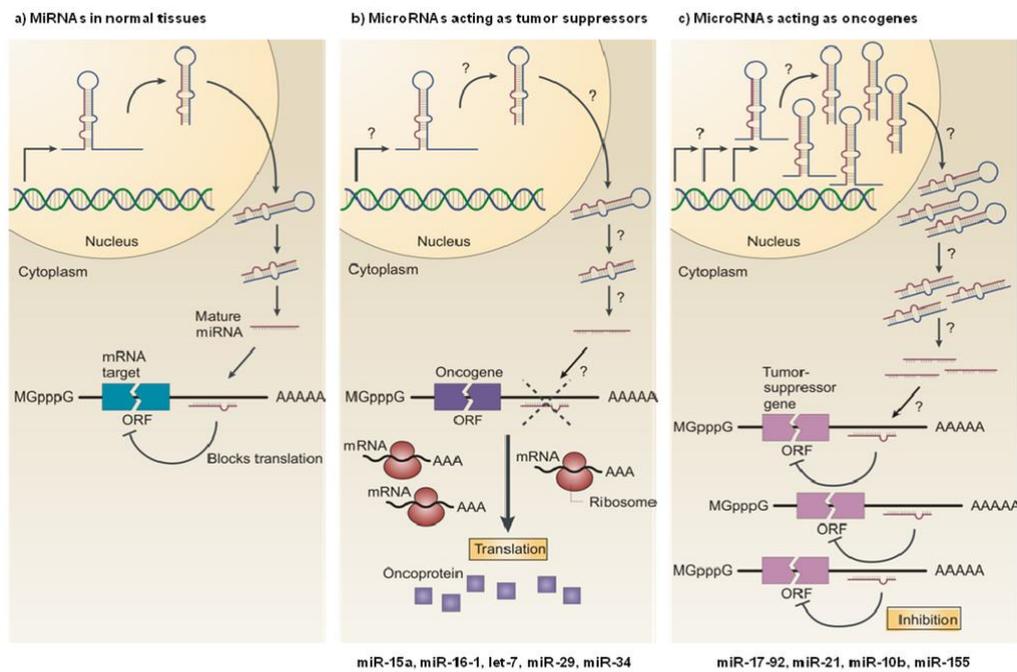


Figura 6. miRNA soppressori tumorali e miRNA oncogeni. a) Nel tessuto normale l'espressione dei miRNA influenza la crescita cellulare, la proliferazione, il differenziamento e la morte cellulare. b) La riduzione e/o la perdita di un miRNA che funziona da soppressore tumorale determina lo sviluppo del tumore mediante l'aumento di espressione della sua oncoproteina bersaglio. c) L'amplificazione di un miRNA oncogeno determina ridotti livelli di espressione del suo gene oncosoppressore bersaglio, permettendo alla cellula di acquisire caratteristiche neoplastiche come l'aumento del tasso di crescita, dell'invasività e la resistenza all'apoptosi (da *Esquela-Kerscher and Slack, 2006*).

2.1 Introduzione

2.1.1 Piastrine e fisiopatologia dell'attivazione piastrinica

Le piastrine rappresentano i più piccoli elementi figurati del sangue e sono frammenti citoplasmatici che si formano a partire da precursori multinucleati prodotti dal midollo osseo, i megacariociti. Esse hanno un'emivita di circa 10 giorni e in un soggetto sano il loro numero varia da 150.000 a 400.000 per mm^3 di sangue. Le piastrine svolgono un ruolo fondamentale nell'emostasi, ovvero l'insieme dei meccanismi che assicura il mantenimento dell'integrità dei vasi e della fluidità del sangue; esse, infatti, sono direttamente coinvolte nella formazione di un tappo piastrinico in corrispondenza della lesione e sostengono la fase iniziale del processo coagulativo.

Al microscopio elettronico mostrano una struttura piuttosto complessa: la membrana plasmatica si invagina all'interno del citoplasma per formare un sistema di microtubuli noto come "sistema canalicolare aperto", il quale, aumentando la superficie di scambio con l'esterno, permette la secrezione dei granuli in seguito ad attivazione. Sul lato esterno, invece, la membrana plasmatica aderisce al glicocalice, una struttura lipo-proteica-polisaccaridica, da cui sporgono numerose glicoproteine a funzione adesiva e recettoriale, coinvolte nel processo di attivazione e aggregazione piastrinica (Rosati, Colombo 2006).

Da un punto di vista morfologico le piastrine contengono tre tipi di granuli:

- Granuli α , che risultano opachi al microscopio elettronico e che contengono importanti molecole per l'emostasi, per la riparazione delle ferite e per le principali funzioni piastriniche quali fibrinogeno, fibronectina, fattore IV piastrinico, PDGF (*Platelet-Derive Growth Factor* ovvero Fattore di Crescita Derivato dalle Piastrine), fattore di von Willebrand (o fattore VIII), la trombospodina, la β tromboglobulina e il collagene.
- Granuli δ o granuli densi, che contengono serotonina, Ca^{2+} , Mg^{2+} , ADP, ATP, peptidi chemiotattici e fattore piastrinico V.
- Granuli λ , che contengono idrolasi lisosomiali e perossisomi.

Pur essendo prive di nucleo, le piastrine possiedono tutti i principali componenti subcellulari compresi i mitocondri, i lisosomi, il reticolo endoplasmatico liscio (definito sistema tubulare denso) e il citoscheletro, il quale assicura sia il mantenimento di forma della piastrina quando essa è inattiva sia la contrazione piastrinica e la conseguente fuoriuscita del contenuto dei granuli quando essa viene attivata in seguito a lesioni dei vasi sanguigni.

In condizioni fisiologiche le piastrine sono libere di circolare nel sangue e non sono in grado né di aggregarsi tra di loro, né di aderire all'endotelio vascolare, in quanto le membrane plasmatiche sono cariche negativamente e si respingono da un punto di vista elettrostatico. Tuttavia, qualora si verifichi un danno endoteliale, oppure vi sia un fenomeno patologico in atto, le piastrine possono iniziare ad aderire all'endotelio vascolare in seguito ad alcuni stimoli, grazie alla presenza sulla loro superficie di una serie di molecole di adesione appartenenti alla superfamiglia delle integrine (Coller, 1993). Le integrine sono glicoproteine transmembrana eterodimeriche costituite da catene peptidiche α e β unite da legami non covalenti; esistono differenti isoforme di catene α e β che in varie combinazioni determinano la formazione di diverse integrine, ognuna con una specifica funzione nei processi di adesione cellula-cellula, interazione con la matrice extracellulare e trasduzione del segnale dalla matrice alla cellula stessa (Ginsberg *et al.*, 1995).

Nonostante la loro dimensione contenuta e la struttura particolarmente complessa, le piastrine rappresentano uno dei quattro sistemi principali coinvolti nei meccanismi fisiologici e/o patologici del processo emostatico (fig.7).

In seguito a danno vascolare si verifica vasocostrizione a livello della zona lesa e una riduzione della velocità del flusso ematico per cui le piastrine circolanti si spostano dalla periferia al centro del vaso (fenomeno di marginazione delle piastrine) per aderire con maggiore efficienza al sottoendotelio esposto dopo la lesione, costituito soprattutto da collagene, proteoglicani, fibronectina, laminina ed altre glicoproteine. L'iniziale adesione delle piastrine in corrispondenza del sito di danno è mediata dal legame di tali componenti con specifiche integrine presenti sulla superficie piastrinica, come ad esempio l'integrina GPIa/GPIIa-GPVI (anche detta "very late antigen" VLA2) che lega il collagene e le integrine GPIc/IIa (o VLA-6) e GPIc*/IIa (o VLA-5) che funzionano da recettori per la laminina e la fibronectina rispettivamente.

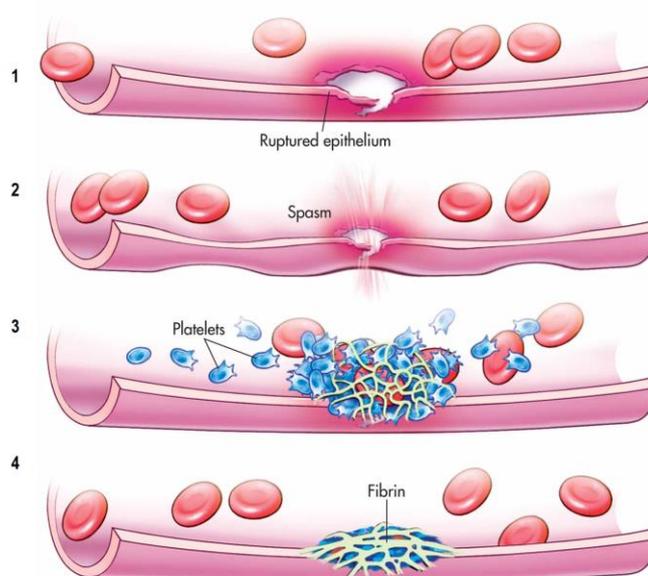


Figura 7. Schematizzazione delle fasi del processo emostatico. In seguito a danno endoteliale (1) si innesca la fase vascolare (2). L'endotelio danneggiato per evitare la perdita di sangue si attiva e induce vasocostrizione. Alla fase vascolare, segue la fase piastrinica (3), durante la quale le piastrine aderiscono all'endotelio danneggiato formando un tappo temporaneo, successivamente stabilizzato da ponti di fibrina (4) (da *Biology-forums.com*).

Affinché questo processo di adesione diventi più stabile è richiesto l'intervento di un'altra molecola di adesione denominata GPIb/IX/V: si tratta di una glicoproteina ricca in leucina (non integrina) con la capacità di legare il Fattore di Von Willebrand (vWF) (Lanza *et al.*, 1993; Ravanat *et al.*, 1997). Tale fattore è presente nel plasma sanguigno, con la funzione di veicolare il fattore VIII della coagulazione, e nelle cellule endoteliali all'interno dei corpi di *Weiber-Palade*. In seguito a danno vasale, tuttavia, esso è rilasciato dall'endotelio, si concentra nella zona lesionata ed interagisce sia con il collagene esposto che con la proteina GPIb, stabilizzando l'adesione tra le piastrine e il sottoendotelio e favorendo la formazione di un

monostrato piastrinico in corrispondenza del sito danneggiato. Il reclutamento addizionale di piastrine richiesto per la formazione del tappo piastrinico è mediato da diversi fattori diffusibili prodotti o rilasciati dopo che l'adesione piastrinica è iniziata, inclusi ADP, trombossano A2 (TXA2) e trombina. Tali mediatori legando recettori accoppiati a proteine G (GPCR) attivano dei *pathway* di segnalazione intracellulare che aumentano la loro stessa produzione secondo un meccanismo a *feedback* positivo e assicurano la rapida attivazione piastrinica e il reclutamento di altre piastrine dal torrente circolatorio. L'azione sinergica di questi attivatori, inoltre, determina il cambiamento di forma, la degranulazione, l'espressione di molecole pro-infiammatorie e l'attivazione delle attività pro-coagulanti delle piastrine. Tutti i *pathway* attivati dai diversi mediatori convergono nell'attivazione del recettore del fibrinogeno (integrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ o complesso glicoproteico GPIIb/IIIa).

Durante la fase piastrinica dell'emostasi, i cui principali eventi sono illustrati in fig.8, esse passano dalla forma normalmente tondeggiante a una stellata (sfera spinosa o *spiny sphere*), caratterizzata dalla presenza di numerosi pseudopodi. Inoltre se lo stimolo che ha provocato il cambio di forma è debole, le piastrine possono riassumere la loro struttura originaria, pur mantenendo una certa refrattarietà ad un'eventuale nuova stimolazione; viceversa quando lo stimolo è forte queste non ritornano più nella loro forma originaria, ma espongono in superficie il Fattore Piastrinico 3 (FP3), una fosfatidilserina che nella piastrina a riposo è situata nel lato interno della membrana plasmatica, mentre dopo gli stimoli di adesione e attivazione viene esposta sul suo lato esterno attraverso un meccanismo *flip-flop*.

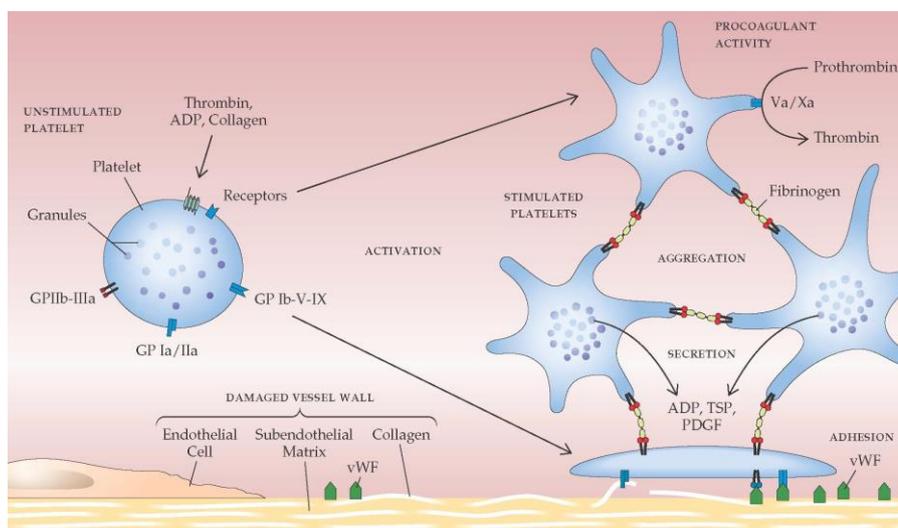


Figura 8. Principali eventi della fase piastrinica. Rappresentazione schematica dei processi di adesione, attivazione e aggregazione della fase piastrinica attivati in seguito a lesioni dell'endotelio vascolare (da <http://what-when-how.com/acp-medicine/hemostasis-and-its-regulation-part-1/>).

La presenza di fosfatidilserine sulla superficie esterna delle piastrine è fondamentale per il processo di coagulazione. Associato ai fenomeni contrattili che promuovono il cambiamento di forma vi è un meccanismo di secrezione dei granuli (*release reaction*

piastrinici) dipendente sia dall'ATP che dal citoscheletro: la contrazione responsabile del cambiamento di forma, infatti, determina il trasporto dei granuli in corrispondenza del sistema canalicolare aperto (centralizzazione dei granuli), la fusione delle membrane dei granuli con le membrane del sistema e il conseguente rilascio del loro contenuto.

Alla degranulazione segue l'aggregazione piastrinica: in questa fase il complesso glicoproteico IIb-IIIa che si forma funziona da recettore per il fibrinogeno, il quale a sua volta forma dei veri e propri "ponti" tra le piastrine, generando così degli aggregati. È possibile distinguere l'aggregazione in primaria e secondaria. L'aggregazione primaria è reversibile ed è indotta da piccole concentrazioni di agonisti che si legano ai loro recettori sulla membrana plasmatica delle piastrine. L'aggregazione secondaria è dovuta sia a più elevate concentrazioni di agonisti sia al rilascio di ADP e TXA2 da parte di piastrine attivate da potenti agonisti in quantità ridotte.

ADP e trombina, in particolare, sono i più potenti attivatori piastrinici e sono in grado di attivare diverse vie di segnalazione intracellulare legando GPCR presenti sulla superficie della membrana plasmatica delle piastrine (fig.9).

La risposta piastrinica all'ADP è mediata da GPCR appartenenti alla famiglia P2Y. Sulla membrana piastrinica sono presenti i recettori P2Y₁ e P2Y₁₂, in grado di promuovere i meccanismi molecolari che portano le piastrine ad attivarsi, a cambiare forma ed infine ad aggregarsi per formare il tappo piastrinico. In particolare, P2Y₁₂ esercita la propria azione attivando una proteina presente sulla parte interna della membrana piastrinica, la proteina G inibitoria (Gi), che a sua volta inibisce l'adenilato ciclasi, con conseguente diminuzione della concentrazione intrapiastrinica di adenosin-monofosfato-ciclico (AMPC); i livelli di AMPC sono inversamente correlati con lo stato di attivazione piastrinica e dunque una sua diminuzione contribuisce ad attivare le piastrine. Dal punto di vista farmacologico P2Y₁₂ è stato maggiormente studiato rispetto agli altri recettori poiché nel corso degli anni sono state sintetizzate molecole in grado di inibire il legame dell'ADP con il recettore stesso. Tali molecole farmacologiche sono le tienopiridine, una categoria di antiaggreganti piastrinici in grado di ridurre l'attivazione piastrinica (Gachet *et al.*, 2008).

Sempre sulla superficie delle piastrine, sono presenti altri tipi di GPCR: si tratta dei recettori attivati dalle proteasi, ovvero i recettori PAR (*Protease Activated Receptor*), caratterizzati da sette domini transmembrana, e da una regione N-terminale extracellulare e una C-terminale intracellulare (Déry *et al.*, 1998). In particolare, sulle piastrine i PAR1 e PAR4 funzionano da recettori per la trombina (Ishihara *et al.*, 1997). Quest'ultima è prodotta in seguito a danno endoteliale dalla pro-trombina circolante e svolge un ruolo importante non solo nell'aggregazione piastrinica, ma anche in altri processi fisiopatologici come l'infiammazione, l'aterosclerosi e le malattie cardiovascolari. Quando la trombina attiva i propri recettori, c'è un taglio proteolitico della loro porzione N-terminale (meccanismo di attivazione dipendente dall'agonista) (Hollenberg *et al.*, 1997; Andersen *et al.*, 1999).

Un'altra sostanza in grado di stimolare l'adesione e l'aggregazione piastrinica è il peptide sintetico TRAP (*Thrombin Receptor Agonist Peptide*): questo mima l'estremità N-terminale proteolizzata del recettore della trombina e attiva in maniera potente il recettore trombinico determinando attivazione, secrezione e aggregazione secondo un meccanismo indipendente dal taglio del recettore.

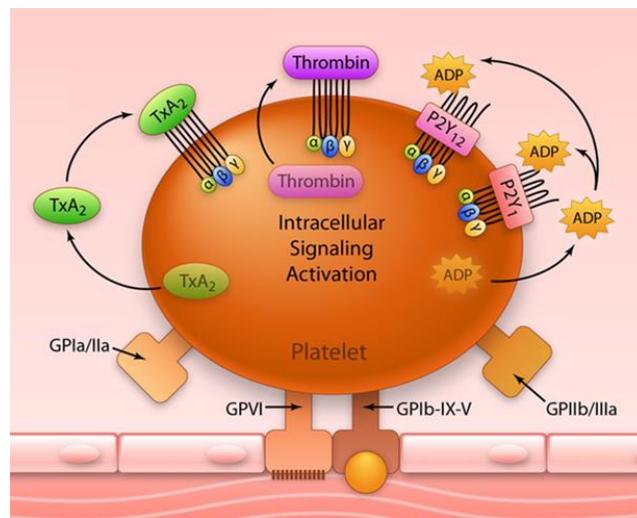


Figura 9. Agonisti fisiologici e recettori di membrana. Sono illustrati i GPCR presenti sulla membrana piastrinica che funzionano da recettori per gli attivatori fisiologici ADP, trombina e TxA₂ (modificata da <http://circresearch.com/gallery/tag/acute-coronary-syndrome/>).

2.1.2 microRNA e piastrine

Le piastrine svolgono un ruolo importante nella patogenesi di alcune malattie cardiovascolari, compresi i disordini occlusivi e l'aterosclerosi. Sebbene i processi di adesione, attivazione ed aggregazione piastrinica avvengano durante l'emostasi a seguito di una lesione dell'endotelio vascolare, qualora essi si verificano all'interno di coronarie, arterie periferiche o a livello di una placca aterosclerotica vulnerabile potrebbero aumentare enormemente il rischio di ictus e l'insorgenza di una sindrome coronarica acuta. I *pathway* che regolano l'attività e la reattività piastrinica sono dunque fondamentali per lo sviluppo e/o la progressione dei disordini cardiovascolari occlusivi. È noto, inoltre, che le piastrine pur essendo prive di nucleo possiedono numerosi trascritti ereditati dai megacariociti e il macchinario di traduzione dell'mRNA, attraverso il quale esse sono in grado di effettuare sintesi proteica *de novo* e di modificare la loro stessa funzionalità in risposta a stimoli di natura fisiologica o patologica (Freedman, 2011). Numerosi sono gli studi che rivelano la presenza anche di *small* RNA nelle piastrine (di cui ben l'80% è rappresentato da miRNA) (Starczynowski *et al.*, 2010) e dei complessi multiproteici coinvolti nel *pathway* di processamento dei miRNA, inclusi *Dicer*, TRBP2 (TAR RNA-binding protein 2) e AGO2 (McManus *et al.*, 2015). Nonostante alterazioni dell'aggregazione piastrinica siano frequentemente associate a fattori di rischio quali il fumo, l'ipertensione e l'ipercolesterolemia, è stato dimostrato un coinvolgimento dei miRNA nel controllo della reattività piastrinica (Kondkar *et al.*, 2010). Kondkar *et al.* hanno provato infatti che miR-96 regola l'espressione di VAMP8/endobrevina, implicata nel rilascio del contenuto dei granuli piastrinici: aumentati livelli della proteina VAMP8 (e del corrispondente mRNA) sono strettamente correlati con una maggiore reattività

piastrinica e con una ridotta espressione di miR-96 di cui essa è bersaglio molecolare.

La regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica mediata dai miRNA non solo influenza la reattività ma svolge un ruolo fondamentale anche nel controllo delle funzioni piastriniche.

La presenza di un *network* di miRNA nelle piastrine sembra permettere ad esse di regolare l'espressione di recettori di superficie e di modificare la loro capacità di aggregarsi. In particolare, miR-223, il miRNA più espresso nelle piastrine, è in grado di legare la regione 3'UTR dell'mRNA che codifica per il recettore dell'ADP P2Y₁₂: il suo legame con l'mRNA bersaglio, infatti, determina una riduzione dei livelli di espressione del recettore, inibendo i processi di aggregazione e degranulazione (Landry P *et al.*, 2009).

I miRNA e le proteine chiave del loro *pathway* di maturazione (come ad esempio *Dicer*) sono inoltre implicati nell'ematopoiesi (Raaijmakers *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2004; Georgantas *et al.*, 2007; Monticelli *et al.*, 2005), nella differenziazione delle cellule staminali embrionali (Tay *et al.*, 2008), nell'eritropoiesi (Bruchova *et al.*, 2007) e nella megacariocitopoiesi, ovvero il processo di sviluppo cellulare che porta alla produzione di piastrine. L'espressione di mRNA bersaglio coinvolti nel processo di formazione delle piastrine è controllata da miRNA con un'azione antagonista: miR-150 infatti favorisce la megacariocitopoiesi, a differenza di miR-155 che ha un effetto opposto (Edelstein *et al.*, 2013). L'iperespressione di miR-155, in cellule K562 causa il blocco della differenziazione dei megacariociti, nonché una diminuzione dei livelli di eritrociti, megacariociti e linfociti (O'Connell *et al.*, 2008).

Biologicamente e clinicamente i miRNA piastrinici sono quindi potenziali biomarcatori di disordini ematologici e della reattività piastrinica, il cui studio è necessario per la comprensione dei meccanismi alla base dell'espressione genica nei megacariociti e nelle piastrine.

2.2 Scopo del lavoro

L'attivazione piastrinica svolge un ruolo fondamentale nella trombogenesi e nella patogenesi di disordini vascolari occlusivi, comprese le sindromi coronariche acute. I frequenti eventi di resistenza alle terapie anti-trombotiche suggeriscono, tuttavia, l'esistenza di meccanismi fisiopatologici dell'attivazione piastrinica non ancora ben chiariti. Le piastrine, a differenza delle cellule circolanti nel sangue, non possiedono il nucleo ma come queste sono in grado di effettuare sintesi proteica *de novo* a partire da trascritti ereditati dai megacariociti in seguito ad attivazione o in determinate condizioni patologiche. Uno dei meccanismi di regolazione dell'espressione genica nelle cellule eucariotiche è mediato a livello post-trascrizionale dai miRNA, la cui attività, come ben noto, consente di bloccare la traduzione di un mRNA bersaglio in proteina. Studi recenti hanno dimostrato la presenza di questi piccoli RNA non codificanti all'interno delle piastrine, attribuendo loro la probabile attività di modulatori piastrinici. Scopo principale del lavoro è stato stabilire in che modo le piastrine siano in grado di modificare il proprio proteoma (e quindi la loro stessa funzionalità) in seguito ad attivazione, al fine di ottenere una maggiore comprensione dei meccanismi fisiopatologici che regolano questo processo e di sperimentare nuove

strategie terapeutiche per la cura dei disordini vascolari occlusivi, responsabili del maggior tasso di mortalità nei paesi occidentali.

2.3 Risultati e discussione

2.3.1 Effetti dell'attivazione sul profilo di espressione degli mRNA piastrinici

Plasma ricco di piastrine (PRP) è stato ottenuto dal sangue intero di ciascuno dei 15 volontari reclutati per condurre lo studio, come descritto in Materiali e Metodi, ed opportuni controlli sono stati effettuati per valutare l'eventuale contaminazione leucocitaria. La purezza del PRP è stata analizzata mediante esperimenti di citometria a flusso in collaborazione con il Dipartimento di Scienze Toraciche e Respiratorie della Seconda Università di Napoli e analisi di RT-qPCR dei livelli di espressione dell'antigene di superficie CD45 specifico dei leucociti e quelli dell'antigene CD41 specifico invece delle piastrine (Landry P *et al.*, 2009).

Com'è possibile osservare in fig.10, il PRP purificato e filtrato mostra la presenza solo dell'antigene piastrinico CD41 corrispondente alla banda di 481bp rilevata. L'assenza di una banda corrispondente all'antigene leucocitario CD45 nel prodotto amplificato mediante PCR ha confermato l'assenza di contaminazioni macroscopiche da leucociti e che il PRP isolato fosse idoneo per condurre gli esperimenti successivi.

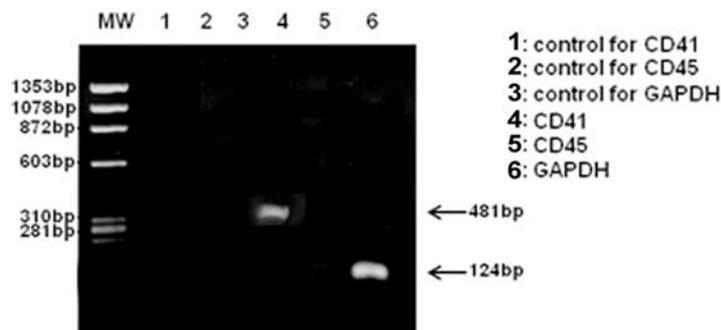


Figura 10. Analisi qualitativa del PRP purificato. RT-qPCR dei livelli di espressione degli antigeni di superficie CD41 e CD45 nel PRP dopo filtrazione; GAPDH è stato utilizzato come controllo.

Come riportato in Materiali e Metodi, le piastrine purificate da ogni donatore sono state divise in 4 aliquote differenti, di cui una è stata processata immediatamente dopo la preparazione ed utilizzata come controllo basale (T0), mentre le restanti 3 sono state trattate con ADP, collagene (COLL) o TRAP e sottoposte ad attivazione *in vitro* per 120 minuti a 37°C in agitazione.

Gli effetti dell'attivazione indotta con i diversi agonisti sul trascrittoma piastrinico sono stati studiati grazie alla caratterizzazione dei profili di espressione degli mRNA mediante RNA-Seq. Tale metodica consente di ottenere un *range* dinamico di rilevazione (da livelli molto bassi a livelli più alti di RNA) e di misurare differenze di espressione tra i campioni talvolta anche minime. I 15 campioni di RNA totale isolato dopo attivazione dal PRP di ciascun volontario sono stati combinati in 3 gruppi (replicati biologici), i quali una volta preparate le librerie indicizzate sono stati

2 volte (replicati tecnici). La procedura seguita per la preparazione delle librerie di sequenziamento ha permesso di purificare tutti i trascritti espressi nelle piastrine (*Total RNA Seq*) e non solo quelli codificanti proteine (mRNA Seq).

Di conseguenza, i risultati del sequenziamento hanno permesso di identificare 10800 RNA espressi significativamente nelle piastrine, di cui circa il 20% è rappresentato da RNA non codificante ed appartenente a differenti famiglie, quali i *linc* RNA (*large intergenic non coding RNA*) e gli snoRNA.

Una volta identificati i trascritti espressi, l'analisi differenziale dei livelli di espressione ha mostrato esigui cambiamenti del trascrittoma piastrinico in seguito ad attivazione *ex vivo*, per lo più rappresentati da mRNA la cui espressione si riduce rispetto ai valori basali. Per questo tipo di analisi è stato considerato un *p-value* ≤ 0.05 ed un *Fold-Change* (FC) ≤ -1.3 e ≥ 1.3 , dove per FC si intende il rapporto tra i livelli di espressione di un trascritto nelle piastrine attivate e quelli dello stesso trascritto nel controllo (T0). Dall'analisi è emerso, infatti, che dei 10800 trascritti espressi significativamente soltanto 102 sono differenzialmente espressi in risposta a COLL e 356 in risposta a TRAP (fig. 11). Tali risultati, dunque, dimostrano che l'attivazione *ex vivo* con diversi attivatori fisiologici influenza in minima parte il trascrittoma piastrinico (circa lo 0,2%), con cambiamenti che si riflettono soprattutto nella riduzione dei livelli di espressione di alcuni trascritti dopo lo stimolo attivatorio.

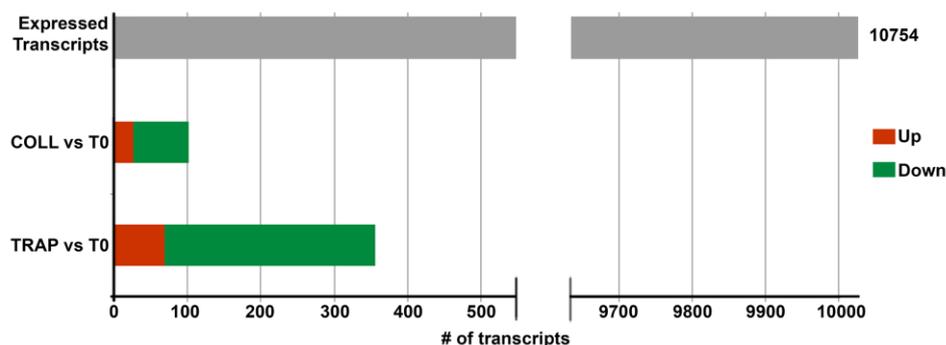


Figura 11. Effetti dell'attivazione *ex vivo* con COLL e TRAP sul trascrittoma piastrinico. Trascritti differenzialmente espressi in seguito ad attivazione con COLL e TRAP rispetto ai valori di espressione basali (T0) (*p-value* ≤ 0.05 e FC ≤ -1.3 e ≥ 1.3). In rosso sono mostrati i trascritti i cui livelli di espressione aumentano dopo attivazione, mentre in verde sono rappresentati i trascritti per i quali si verifica una diminuzione dell'espressione dopo attivazione.

2.3.2 Analisi quantitative del proteoma piastrinico dopo attivazione

Per valutare gli effetti dell'attivazione sul proteoma piastrinico, le proteine totali isolate prima e dopo trattamento con TRAP o COLL sono state sottoposte ad analisi di proteomica quantitativa iTRAQ (*isobaric Tag for Relative Quantitation*) in collaborazione con l'Istituto di Biotecnologie dell'Università di Helsinki. Questa metodica permette di identificare cambiamenti in termini quantitativi del proteoma di

un campione/soggetto trattato rispetto ad un controllo. Essa utilizza reagenti "isobarici" per marcare le amine primarie delle proteine presenti in una miscela complessa da analizzare. La quantizzazione è poi resa possibile dall'analisi dei gruppi *reporter* generati durante la frammentazione dei peptidi nello spettrometro di massa. Dall'analisi così effettuata, complessivamente, sono state identificate 919 proteine, di cui 732 quantificate in modo affidabile. La distribuzione globale dei dati di iTRAQ e il coefficiente di variazione (CV) mostrano una stretta correlazione tra i replicati (con CV di 0,20 e 0,17 per i campioni COLL e TRAP rispettivamente).

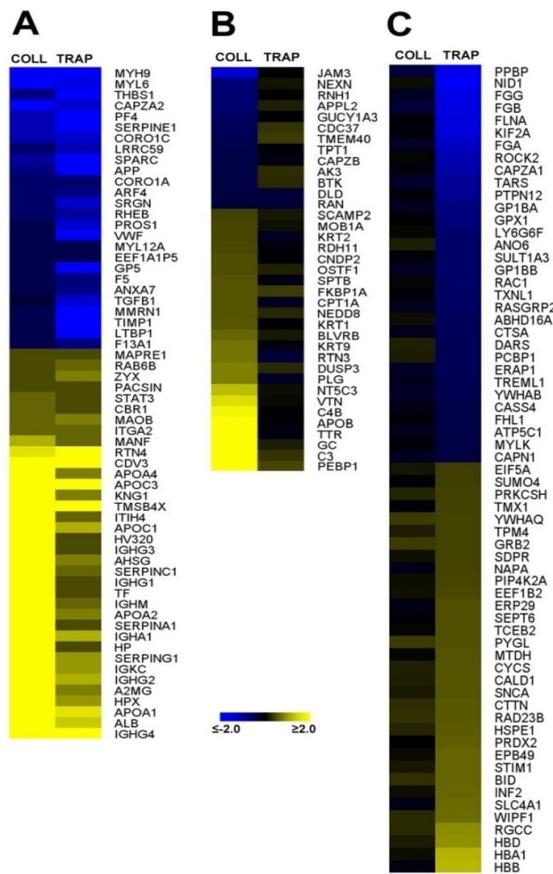


Figura 12. Effetti dell'attivazione *ex vivo* con COLL e TRAP sul proteoma piastrinico. Delle 732 proteine quantificate mediante proteomica quantitativa iTRAQ, 292 sono regolate dopo attivazione con COLL e 297 dopo attivazione con TRAP, e di queste 143 (circa la metà quindi) sono modulate in seguito ad attivazione con entrambi gli agonisti. In (A) sono riportate le proteine i cui livelli di espressione cambiano in maniera concorde in seguito ad attivazione con COLL e TRAP. In (B) e in (C) sono mostrate le proteine modulate dopo attivazione rispettivamente con COLL o TRAP.

Gli esperimenti di proteomica quantitativa hanno rivelato, inoltre, che ben il 65% delle proteine sul totale di quelle identificate presenta variazioni significative dei livelli di espressione dopo attivazione in entrambi i replicati biologici ($p\text{-value} \leq 0.05$ e $FC \leq -1.3$).

e ≥ 1.3). Le proteine che mostrano un cambiamento significativo in risposta ai due attivatori sono state classificate in 3 gruppi: un primo gruppo di proteine i cui livelli di espressione cambiano con lo stesso andamento in seguito ad attivazione con COLL e TRAP (fig. 12A), un secondo gruppo che comprende le proteine regolate da COLL (fig. 12B) ed un terzo gruppo di proteine modulate dopo stimolazione con TRAP (fig. 12C). I risultati ottenuti mostrano che TRAP è l'agonista più forte e per tale motivo sul gruppo di proteine da esso modulate è stata condotta un'analisi di *Gene Ontology* (GO) mediante il *software* IPA, valutando sia le categorie funzionali (fig.13A) sia i processi biologici (GO-BP, fig.13B) arricchiti significativamente. Tali proteine sono coinvolte nella risposta infiammatoria, nell'immunità, nello sviluppo del sistema cardiovascolare, nel movimento cellulare e nella segnalazione cellula-cellula.

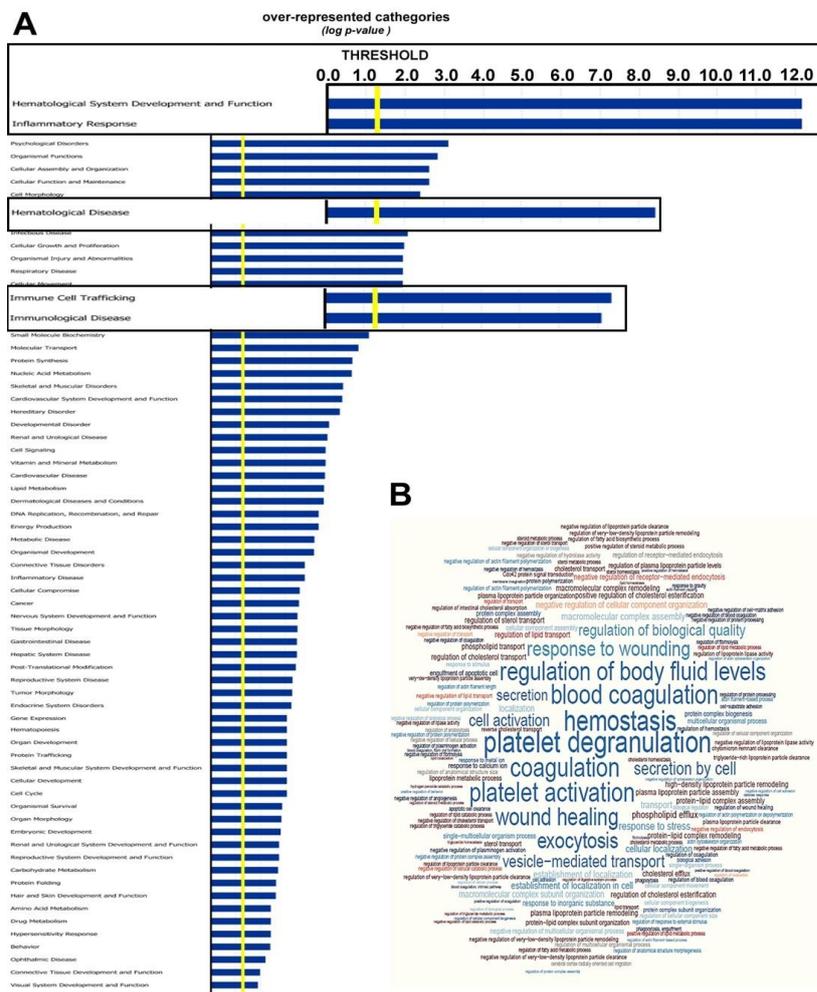


Figura 13. Analisi funzionale delle proteine modulate dopo attivazione con TRAP. In figura sono mostrate le categorie funzionali (A) e i processi biologici (B) arricchiti ottenuti dall'analisi di GO condotta con il *software* IPA. In (A) le categorie sono riportate come istogrammi e l'arricchimento è espresso come log del *p-value* mentre in (B) sottoforma di parole (*word cloud*), la cui grandezza è inversamente proporzionale al *p-value*.

Successivamente, dal confronto dei dati di proteomica quantitativa con quelli di RNA-Seq è stata trovata una scarsa corrispondenza tra le variazioni dei livelli di espressione delle proteine modulate dopo attivazione con COLL o TRAP e i livelli di espressione degli mRNA corrispondenti (fig.14). Infatti, i cambiamenti di espressione delle proteine dopo attivazione con COLL o TRAP significativi in entrambi i replicati biologici ($p\text{-value} \leq 0.05$ e $FC \leq -1.3$ e ≥ 1.3) si verificano, nella maggior parte dei casi, in assenza di modulazione dei relativi trascritti.

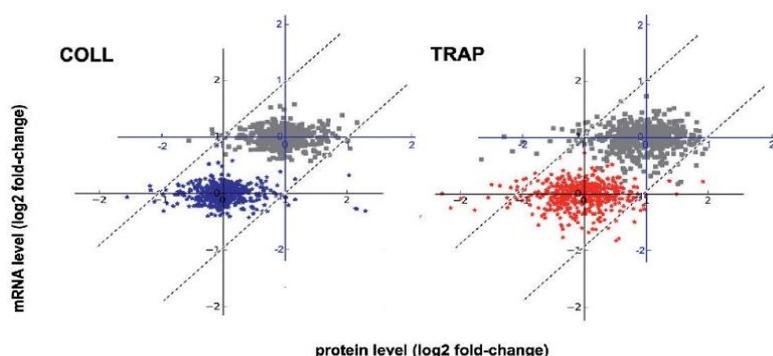


Figura 14. Confronto tra i cambiamenti di espressione delle proteine modulate dopo attivazione e dei corrispondenti trascritti. Scatter plot in cui è possibile osservare la scarsa correlazione tra i livelli di espressione delle proteine regolate in seguito a stimolazione con COLL o TRAP con quelli dei corrispettivi mRNA ($p\text{-value} \leq 0.05$ e $FC \geq 1.3$).

Questi risultati suggeriscono che gli stimoli di attivazione promuovono una rapida ed estesa riorganizzazione del proteoma piastrinico che può dipendere, come già noto in letteratura, sia da variazioni della stabilità della proteina sia dalla capacità di effettuare sintesi proteica *de novo* a partire dai trascritti ereditati dai megacariociti in seguito ad attivazione o in condizioni patologiche (Gnatenko *et al.* 2009; Bray *et al.* 2013).

2.3.2 Effetti dell'attivazione sul miRNoma piastrinico

Successivamente, partendo dalle evidenze sperimentali che dimostrano la presenza dei miRNA nelle piastrine (Landry P *et al.*, 2009), è stata investigata l'ipotesi dell'esistenza di meccanismi di regolazione post-trascrizionale mediati da tali piccoli RNA non codificanti che riuscissero a spiegare come alla riprogrammazione del proteoma non fosse associata la variazione dei trascritti in risposta all'attivazione piastrinica.

In primo luogo è stata valutata la presenza di fattori chiave coinvolti nel processamento e nella maturazione dei miRNA. Le proteine totali estratte dal PRP nelle condizioni basali (T0) provenienti da ciascuno dei 15 volontari sono state combinate in gruppi e sottoposte ad *SDS-PAGE* e *Western Blotting* (fig.15). I risultati ottenuti mostrano che le piastrine quiescenti possiedono i principali componenti del *pathway* citoplasmatico di maturazione e regolazione dei miRNA, quali le proteine

Argonata (Ago 1, 2 e 3), Dicer (Dicer 1, una ribonucleasi di Tipo III), TRBP (*TAR (HIV-1) RNA Binding Protein 2*), GW182 (*Trinucleotide repeat Containing 6A*) e CCR4-NOT (*CCR4-NOT Transcription Complex*, subunità 1).

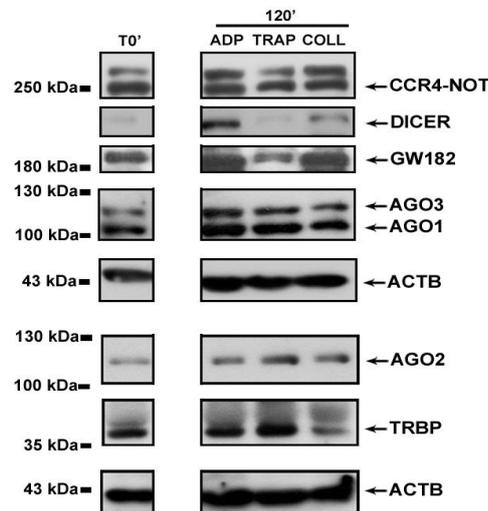


Figura 15. Esistenza di un *pathway* citoplasmatico di maturazione e di regolazione dei miRNA influenzato dall'attivazione *ex vivo*. Analisi di *Western Blotting* mostrano la presenza all'interno delle piastrine dei principali complessi proteici coinvolti nella maturazione da pre-miRNA a miRNA maturo (Dicer, TRBP) e nella regolazione dell'attività dei miRNA sugli mRNA bersaglio (Ago1-4, GW182, CCR4-NOT) e che la loro espressione varia dopo attivazione in maniera dipendente dalla natura dello stimolo attivante.

Non sono stati identificati, invece, componenti nucleari coinvolti nella biogenesi dei miRNA come la ribonucleasi *Drosha*, confermando l'assenza di contaminazione leucocitaria nei campioni di piastrine purificate utilizzati. Dai risultati ottenuti dal sequenziamento non sono stati rilevati pri-miRNA nelle piastrine (Plé *et al.*, 2012), suggerendo che esse possiedono solo il macchinario di maturazione dei miRNA in grado di processare i pre-miRNA ereditati da megacariociti.

Com'è possibile osservare in fig. 14, inoltre, l'attivazione *in vitro* influenza i livelli piastrinici delle proteine del *pathway* funzionale dei miRNA in maniera dipendente dalla natura dello stimolo attivante: ad esempio, mentre l'espressione di AGO2 aumenta in maniera regolare dopo trattamento con tutti gli agonisti, i livelli di TRBP aumentano in seguito a stimolazione TRAP, rimangono pressoché invariati dopo attivazione con ADP ma si riducono notevolmente rispetto ai valori basali se trattate con COLL. Data la struttura multiproteica del complesso RISC, questi risultati indicano che ciascun agonista utilizzato è in grado di modificare la stechiometria di tale complesso e, di conseguenza, le vie biosintetiche e funzionali dei miRNA.

Al fine di valutare se l'attivazione potesse influenzare il profilo di espressione dei miRNA (miRNoma), l'RNA estratto dalle piastrine in condizioni basali T0 o dopo stimolazione con ADP, TRAP o COLL è stato utilizzato per un esperimento di *smallRNA-Seq*, che ha permesso di effettuare l'analisi globale del miRNoma prima e

dopo attivazione con gli agonisti fisiologici. Nonostante COLL e TRAP siano gli attivatori più forti, per questo esperimento è stata indotta attivazione anche con l'agonista più debole ADP, affinché potessero essere rilevati anche i minimi effetti sull'espressione dei miRNA. Sono stati così identificati più di 380 miRNA espressi significativamente, di cui 66 regolati allo stesso modo in seguito ad attivazione con i diversi agonisti (fig. 16A, $p\text{-value} \leq 0.05$ e $FC \geq 1.2$). Questi risultati suggeriscono non solo che i cambiamenti del profilo di espressione dei miRNA sono parte della risposta piastrinica agli stimoli attivanti ma anche che tale risposta può non dipendere dalla natura dello stimolo stesso.

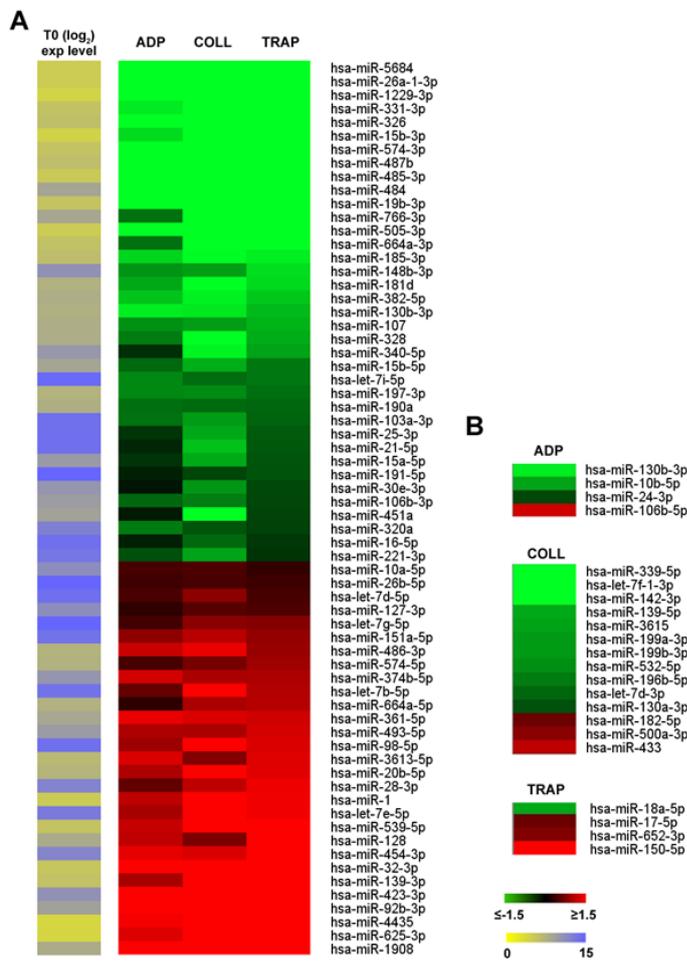


Figura 16. Effetto dell'attivazione in vitro sul miRNoma. In (A) sono mostrati i miRNA regolati significativamente in seguito ad attivazione indotta con ADP, COLL e TRAP ($p\text{-value} \leq 0.05$ e $FC \geq 1.2$), i cui livelli di espressione non dipendono dalla natura dello stimolo attivante. In (B) sono riportati i miRNA specificamente regolati dopo trattamento con ADP, COLL o TRAP. Le differenze di espressione sono calcolate rispetto al controllo T0 (log₂ dei valori di espressione normalizzati).

Com'è possibile osservare, nonostante i maggiori effetti si manifestino stimolando con TRAP in accordo con i dati ottenuti in precedenza, tutti i miRNA modulati con lo stesso andamento sono equamente distribuiti in termini di aumento o diminuzione dei livelli di espressione dopo attivazione. I meccanismi che promuovono un aumento dei livelli di espressione dei miRNA potrebbero essere correlati ad una maggiore espressione dei componenti del complesso di maturazione dei pre-miRNA quali *Dicer*, AGO2 e GW182, che vanno ad influenzare direttamente i livelli piastrinici di miRNA maturi. La riduzione dei piccoli RNA non codificanti potrebbe verificarsi, invece, in seguito a modificazioni che ne compromettono la stabilità come l'adenilazione e l'uridilazione (Plé *et al.*, 2012).

Successivamente, analisi *in silico* sono state condotte per identificare i putativi mRNA bersaglio dei miRNA regolati ed è risultato che la maggior parte di essi codifica per le proteine i cui livelli di espressione cambiano in seguito ad attivazione. Inoltre, in alcuni casi è stata osservata una correlazione inversa tra i livelli di espressione dei miRNA e quelli degli mRNA, suggerendo un possibile effetto degli RNA non codificanti sulla stabilità del messaggero bersaglio (Bartel *et al.*, 2004) tuttavia, nella maggior parte dei casi, i trascritti non cambiano in relazione alle variazioni dei miRNA di cui sono *target*.

Affinché i miRNA possano legare RNA più lunghi è necessario che essi si associno a specifiche proteine (*RNA binding proteins*) per formare il complesso RISC o microRNP (*microRNARibonucleic-Protein Complex: miRNP*), all'interno del quale il miRNA stesso funge da guida per lo specifico riconoscimento del bersaglio (Hammond *et al.*, 2000; Hutvagner *et al.*, 2002). Quando la complementarietà tra miRNA e mRNA bersaglio è solo parziale il principale ruolo del complesso miRNP/RISC è inibire la traduzione del messaggero in proteina lasciandone, tuttavia, invariati i livelli di espressione. Tali osservazioni suggeriscono che il complesso miRNP/RISC piastrinico, nella maggior parte dei casi, potrebbe non contenere l'endonucleasi AGO2, centro catalitico del complesso stesso; ciò sarebbe in accordo con i risultati finora ottenuti che mostrano una ridotta presenza di AGO2 nelle piastrine in condizioni basali rispetto ad AGO1 e AGO3 e spiegherebbe la mancanza di correlazione tra i livelli dei trascritti (che non vengono quindi degradati) e i livelli dei miRNA di cui sono bersaglio. Inoltre, diversi studi hanno dimostrato che la complementarietà tra la regione 3'-UTR degli mRNA e le corrispondenti sequenze presenti sui miRNA può essere inferiore nelle piastrine rispetto ad alcuni tipi di cellule (Chi *et al.*, 2012) ed anche in questo caso il risultato è una ridotta stabilità dell'ibrido miRNA-RNA e, di conseguenza, una riduzione dell'efficienza del processo endonucleolitico del complesso RISC.

Al fine di comprendere il significato biologico della modulazione del miRNoma e la conseguente riorganizzazione del proteoma piastrinico in seguito ad attivazione, sono stati analizzati i *target* dei miRNA responsivi a TRAP, la maggioranza dei quali variava in modo simile anche dopo stimolazione con COLL e ADP. Non sorprende che uno dei *pathway* prevalentemente regolato dall'attivazione piastrinica è quello dei recettori integrine. Gli esperimenti di *smallRNA-Seq* mostrano un aumento dei livelli di espressione di miR-92b-3p, miR-486-3p e let7-e-5p e una riduzione dell'espressione di miR-107 e miR-15b-5p dopo attivazione. In particolare, miR-107 ha come bersaglio l'mRNA codificante per CRKL (*Crk-like protein*), una proteina di adesione focale che insieme alle proteine tensina e paxillina è coinvolta nel *signaling* delle integrine. Bersaglio di miR-15b-5p è invece l'mRNA codificante per la proteina zixina coinvolta

nella formazione dei filamenti di actina, nel riarrangiamento citoscheletrico e nella motilità cellulare (Hirota *et al.*, 2000).

Analisi di GO condotte con il *software* IPA hanno mostrato che altri *pathway* sono influenzati in maniera significativa dalle variazioni del miRNoma dopo attivazione, comprese la risposta infiammatoria-immunitaria e l'ipersensibilità, suggerendo che i componenti di tali *pathway* funzionali possono essere potenziali bersagli della regolazione mediata dai miRNA durante l'attivazione piastrinica.

3.1 Introduzione

3.1.1 Il carcinoma endometriale

Il carcinoma dell'endometrio (CE) o del corpo uterino, origina dalle ghiandole della mucosa che riveste la cavità del corpo dell'utero; esso è tra i più diffusi tumori del sesso femminile insieme al carcinoma della mammella, del colon e del polmone e si manifesta più frequentemente in età post-menopausale, con un'incidenza massima tra i 55 e i 65 anni (Landis *et al.*, 1999).

I principali fattori di rischio predisponenti all'insorgenza del tumore dell'endometrio sono l'obesità, la menopausa tardiva o un menarca precoce, nulliparità, il diabete e l'ipertensione, malattie croniche del fegato e delle vie biliari e malattie ginecologiche come la sindrome dell'ovaio policistico e l'iperplasia endometriale. Tra i più importanti fattori di rischio vi è, inoltre, l'eccessiva esposizione ad estrogeni in assenza o in presenza di ridotti livelli di progesterone: gli estrogeni, infatti, stimolano la proliferazione delle cellule della mucosa ghiandolare dell'endometrio che, in mancanza dell'azione antagonizzante del progesterone, può determinare sviluppo tumorale.

Il rischio di sviluppare il CE aumenta anche in seguito a somministrazioni prolungate di tamoxifene (Kalampokas *et al.*, 2013), un farmaco antitumorale appartenente alla famiglia dei modulatori selettivi del recettore degli estrogeni α utilizzato nella terapia ormonale del cancro della mammella. Numerosi sono infatti gli studi che hanno dimostrato che il tamoxifene aumenta l'incidenza di tumore a causa dell'effetto pro-estrogenico sull'endometrio dose-dipendente.

Sulla base delle caratteristiche istologiche, il CE può essere classificato in adenocarcinoma endometriode, adenocarcinoma sieroso-papillare, mucinoso, squamocellulare, indifferenziato e adenocarcinoma misto.

Nel 1983 Bokhman, sulla base di uno studio prospettico clinico-patologico, formulò l'ipotesi dell'esistenza di 2 tipi di CE con diversa patogenesi, definiti di tipo I e di tipo II. I tumori endometriali di tipo I hanno un'incidenza di circa il 70-80% e sono solitamente di tipo endometriode; essi si sviluppano a partire da un'iperplasia regressa (carcinoma preinvasivo o precancerosi) con una patogenesi fortemente legata ai fattori di rischio descritti e, in particolare, all'esposizione agli estrogeni sia esogeni che endogeni. Questo tipo di CE può essere classificato come un tumore estrogeno-responsivo in quanto le cellule cancerose esprimono i recettori degli estrogeni (α e β) e sono in grado di rispondere allo stimolo ormonale promuovendo la proliferazione della mucosa ghiandolare dell'endometrio.

Contrariamente, i tumori endometriali di tipo II sono meno comuni (10-20% dei casi), derivano tipicamente da un endometrio di tipo atrofico e sono correlati ad un'istologia di tipo non endometriode con morfologia sieroso-papillare a cellule chiare (Emons *et al.*, 2000). Generalmente, il CE di tipo II non è associato all'esposizione agli estrogeni e in generale, nella sua patogenesi non sono implicati fattori di rischio ormonali.

Un recente studio ha però messo in discussione la netta distinzione tra questi tipi di CE, evidenziando che la storia riproduttiva, l'età del menarca, il diabete, il fumo, l'uso di contraccettivi orali sono associati con entrambi i tipi di tumore, mentre l'obesità solo con il tipo I. Tale studio, infatti, suggerisce che i due tipi di carcinoma hanno molti fattori di rischio in comune, e che l'eziologia del CE di tipo II potrebbe non essere totalmente indipendente dagli estrogeni, come creduto finora (Setiawan *et al.*, 2013).

Recentemente è stato evidenziato il ruolo chiave di specifici miRNA nel CE, la cui espressione differenziale può essere definita come un probabile mezzo diagnostico-prognostico, indicandoli come possibili marcatori biologici tumorali (Boren *et al.*, 2008).

È stato osservato, infatti, un aumento di espressione nei tessuti cancerosi endometriali rispetto ai normali di diversi miRNA tra cui miR-185, miR-106a, miR-181a, miR210, miR-423, mentre miRlet7e, miR-221, miR-30c, miR-99b, e miR-193b subiscono una diminuzione di espressione nel tessuto canceroso (Wu *et al.*, 2009).

Si ipotizza, inoltre, che l'espressione di certi miRNA nel CE sia influenzata da meccanismi epigenetici e, in particolare, dallo stato di metilazione del DNA e di acetilazione degli istoni. Nelle cellule cancerose endometriali, ad esempio, l'ipermetilazione e la deacetilazione istonica determinano una riduzione di espressione di miR-129-2, responsabile della regolazione post-trascrizionale del gene e, di conseguenza, della proteina SOX4 (*SRY-related high-mobility group box 4*): si tratta di un fattore di trascrizione sovra-espresso in molte forme di cancro, responsabile della regolazione di importanti vie intracellulari come il *signaling Wnt/β-catenina* e direttamente coinvolto nel EMT (Transizione Epitelio-Mesenchimale), nella crescita del tumore primario e nel processo metastatico.

3.2 Scopo del lavoro

L'aberrante espressione dei miRNA e degli altri sncRNA nel cancro è associata a specifici fenotipi clinici, allo stadio del tumore, allo sviluppo di metastasi e alla resistenza alle terapie. Partendo da tali evidenze sperimentali, scopo dello studio è stato identificare una nuova sncRNA "*signature*", comprendente diverse sottoclassi di piccoli ncRNA differenzialmente espressi in tessuti iperplastici e/o tumorali di endometrio rispetto a quelli normali. La definizione di questi sncRNA e dei loro bersagli molecolari potrebbe dare informazioni preziose riguardo i meccanismi non ancora noti alla base del processo di carcinogenesi. Inoltre, essi possono essere utilizzati come potenziali biomarcatori nelle diagnosi precoci non-invasive dell'adenocarcinomale endometriale.

3.3 Risultati e discussione

3.3.1 Caratterizzazione del profilo di espressione dei microRNA e dei *small non-coding RNA* in tessuti di endometrio normali, iperplastici e tumorali

Al fine di identificare i miRNA e i sncRNA coinvolti nella carcinogenesi endometriale, 10 pazienti affette da adenocarcinoma endometriale di tipo I (indicate come 1, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 15, 16 e 17) e 3 risultate sane, cioè non affette da CE in seguito ad isteroscopia, che ha rivelato la presenza esclusiva di polipi endometriali benigni (indicate come 2, 8 e 9) sono state selezionate secondo i parametri clinico-patologici standard (tab.1). Da ciascuna paziente, quando possibile, sono state prelevate 3 biopsie endometriali da tessuto tumorale, iperplastico e dal tessuto normale adiacente, per un totale di 10 tessuti normali (1N, 2N, 3N, 4N, 5N, 7N, 8N, 9N, 14N, 15N), 6 iperplastici (1H,3H,4H,5H,6H,7H) e 10 tumorali (1T, 3T, 4T, 5T, 6T, 7T, 14T, 15T, 16T, 17T). Tali campioni sono risultati essere un modello ideale per condurre lo studio, in quanto analizzare tessuti normali, iperplastici e tumorali isolati dalla stessa

paziente permette di condurre analisi comparate in assenza di variabili inter-individuali sia di tipo genetico che ormonale.

Characteristics	N°	Patients
Age		
>55	7	2,3,6,7,14,15,16
≤55	6	1,4,5,8,9,17
Tissue Categories		
Healthy Control	3	2N,8N,9N
Normal	7	1N,3N,4N,5N,7N,14N,15N
Atypical Hyperplasia	6	1H,3H,4H,5H,6H,7H
Endometrioid	10	1T,3T,4T,5T,6T,7T,14T,15T,16T,17T
Stage (FIGO)		
I-II	9	1T,3T,4T,5T, 7T,14T,15T,16T,17T
III-IV	1	6T
Histological grade		
G1	5	1T,4T,14T,15T,16T
G2	3	3T,7T,17T
G3	2	5T,6T
Lymph node metastasis		
Positive	1	6T
Negative	4	3T,4T,5T,15T
Nx	5	1T,7T,14T,16T,17T
Stage (TNM)		
T1 and T2	9	1T,3T,4T,5T, 7T,14T,15T,16T,17T
T3 and T4	1	6T

Tabella 1. Caratteristiche delle pazienti e delle volontarie sane il cui prelievo biotipico endometriale è stato sottoposto ad esame istologico.

Esperimenti di *small*RNA-seq hanno mostrato una distribuzione bimodale delle *reads* ottenute, caratterizzata soprattutto da sequenze di 22 nucleotidi (corrispondenti alla lunghezza dei miRNA) e, in misura minore, da sequenze di 28-34 nucleotidi (corrispondenti alla lunghezza di altri sncRNA, piRNA compresi). I risultati ottenuti, riportati come grafici a torte in fig. 17A, mostrano come i miRNA siano la classe di sncRNA più abbondantemente espressa, indipendentemente dal tipo di tessuto considerato. Interessante è stato notare che una percentuale, seppur minore, di *reads* allinea con altre classi di sncRNA annotati in banche dati, come piRNA e snoRNA. Questi risultati sono in accordo con quanto detto in precedenza riguardo le nuove evidenze sperimentali che dimostrano un'espressione dei piRNA non limitata soltanto alle cellule germinali ma estesa anche a quelle somatiche.

Sono stati identificati 448 sncRNA espressi in maniera statisticamente significativa (359 miRNA, 62 piRNA e 27 snoRNA). Al fine di investigare se il profilo di espressione di questi sncRNA potesse subire cambiamenti durante il processo di carcinogenesi endometriale è stata condotta un'analisi di espressione differenziale, la quale ha permesso di individuare un gruppo di sncRNA deregolati specificamente nei tessuti iperplastici e tumorali rispetto ai normali in ogni paziente. Dalla combinazione dei dati ottenuti è stato possibile definire un comune *pattern* di deregolazione dei sncRNA costituito da 239 miRNA, 25 piRNA e 12 snoRNA, per i quali si verificano variazioni dei livelli di espressione negli stati patologici rispetto al controllo ($|FC| \geq 1.5$ e $p\text{-value} \leq 0.05$, fig.17 B-C-D).

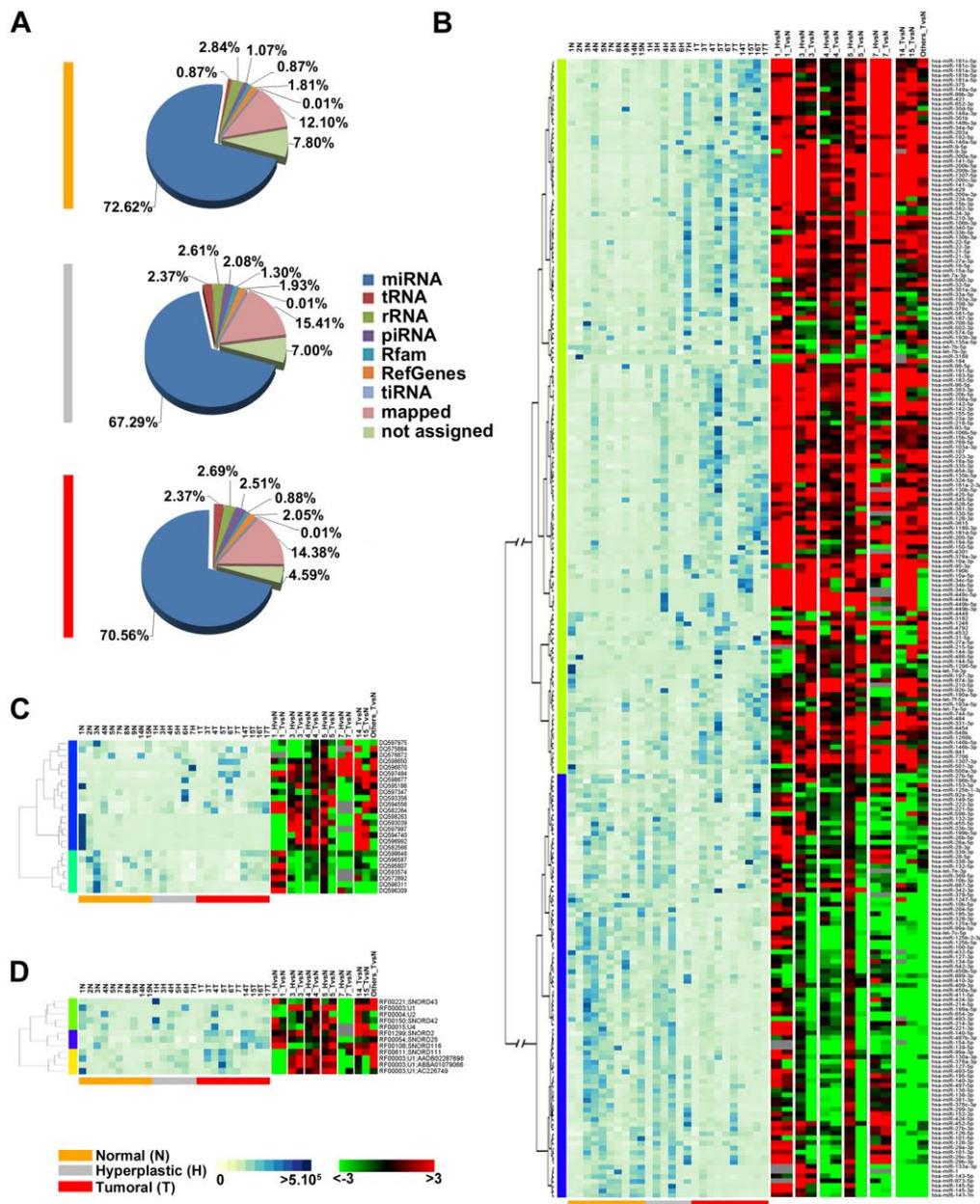


Figura 17. Identificazione dei snRNA espressi e differenzialmente espressi nel tessuto normale, iperplastico e tumorale. **A)** Grafici a torta che riportano con quali percentuali sono espressi le diverse classi di snRNA nei tessuti considerati. **B-C-D)** Heatmap in cui sono mostrati i miRNA (B), i piRNA (C) e gli snRNA (D) differenzialmente espressi nei tessuti iperplastici e/o tumorali rispetto al normale con un $|FC| \geq 1.5$ e $p\text{-value} \leq 0.05$. L'espressione differenziale è stata calcolata considerando i valori di espressione (RPM) in ciascun tessuto. Sono stati considerati solo i snRNA con un read count ≥ 30 in almeno 3 campioni e con un FC significativo in almeno il 50% dei casi.

3.3.2 Identificazione di 7 nuovi potenziali miRNA

Il sequenziamento dei *smallRNA* è una metodica che consente di identificare nuovi sncRNA non ancora annotati in *database*. Per tale motivo, le sequenze scartate dall'analisi perchè non corrispondenti a quelle di miRNA noti, sono state ri-analizzate con il *tool* iMir (Giurato et al., 2013) come descritto in Materiali e Metodi allo scopo di identificare nuovi miRNA coinvolti nella carcinogenesi. Le sequenze riconducibili a tRNA o mRNA (da UCSC Genome Browser), rRNA o piRNA (da Nucleotide NCBI database) e ad altri sncRNA noti (da RFam database) sono stati esclusi prima di effettuare le analisi per ridurre i possibili falsi positivi dalla predizione dei potenziali miRNA. Le *reads* rimanenti sono state analizzate usando l'algoritmo miRDeep2 (Friedlander et al., 2008; Friedlander et al., 2012) integrato nella *pipeline*, mediante il quale è possibile identificare nuovi miRNA con elevata accuratezza. Le sequenze dei precursori dei potenziali miRNA sono state cercate *in silico* e controllate sulla base della loro abilità a formare la struttura *hairpin*, oltre che di caratteristiche come la stabilità termodinamica, la presenza della sequenza *star* e la conservazione filogenetica (Friedlander et al., 2008; Friedlander et al., 2012). Usando questi criteri sono stati identificati 7 potenziali nuovi miRNA (fig.18A), tutti espressi con un numero di sequenze (*read count*) maggiore di 30 in almeno 3 campioni tra quelli selezionati. Ulteriori analisi hanno mostrato, inoltre, che le *seed region* di 6 dei nuovi miRNA individuati allineano con un solo *mismatch* alla sequenza di miRNA di altre specie e sono conservate tra i vertebrati ed in particolare tra i mammiferi. L'analisi differenziale del profilo di espressione di questi potenziali miRNA ha rivelato che alcuni di essi sono più o meno espressi nei tessuti iperplastici e/o tumorali rispetto ai normali in almeno 3 pazienti ($|FC| \geq 1.5$ e $p\text{-value} \leq 0.05$) (fig.18B).

3.3.3 Identificazione dei sncRNA coinvolti nella trasformazione neoplastica endometriale

Al fine di isolare i sncRNA che mostravano un diverso profilo di espressione nei 3 tipi di tessuto endometriale considerati, è stato applicato il test non-parametrico di Kruskal-Wallis. Mediante questo test è stata definita una "*signature*" di sncRNA, che permette di discriminare i tessuti di endometrio sano da quelli tumorali, caratterizzata da 129 miRNA (di cui 2 non ancora annotati in banche dati), 10 piRNA e 3 snoRNA. L'analisi di *clustering* gerarchico condotta sui livelli di espressione dei sncRNA, infatti, ha mostrato una netta separazione dei tessuti cancerosi da quelli normali, con la sola eccezione del campione T1 (fig.19).

Per quanto riguarda i campioni iperplastici, essi sono risultati equamente distribuiti tra tumorali e normali, in accordo con le caratteristiche di eterogeneità di tali lesioni, dovute all'esistenza di diversi stadi di iperplasia atipica non distinguibili con i test standard disponibili. Per meglio definire l'andamento di questi sncRNA implicati nella trasformazione neoplastica dell'endometrio su di essi è stata effettuata un'analisi differenziale ($|FC| \geq 1.5$ e $p\text{-value} \leq 0.05$), da cui è emerso che nel tessuto canceroso rispetto al normale sono sotto-espressi 19 miRNA, 2 piRNA e 1 snoRNA mentre sono sovra-espressi 110 miRNA, 8 piRNA e 2 snoRNA. Confrontando poi i livelli di espressione di tali sncRNA nei tessuti iperplastici e in quelli tumorali, è stato possibile definire 3 diversi gruppi, secondo l'andamento che essi mostravano (fig.20).

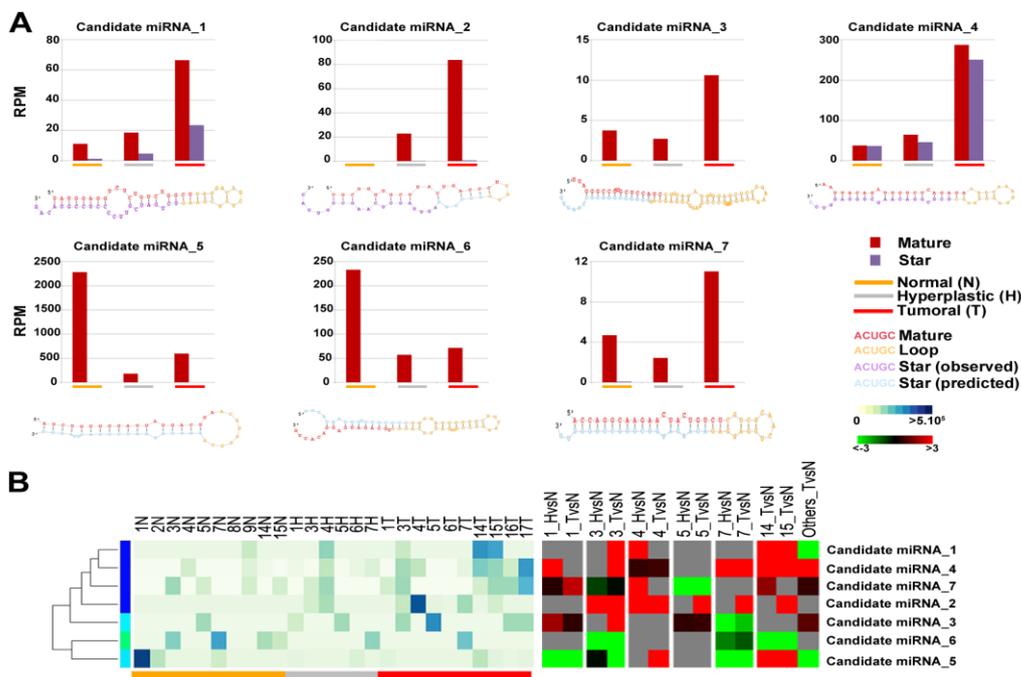


Figura 18. Nuovi potenziali miRNA identificati mediante next generation sequencing. A) Per ciascun nuovo miRNA sono riportati il numero di reads ottenute per ogni tipo di tessuto e la putativa struttura secondaria. In rosso, in giallo, il blu e in viola sono indicati la sequenza matura, la struttura a loop, la sequenza star predetta e quella osservata, rispettivamente. **B)** Heatmap che mostra i livelli di espressione dei 7 nuovi potenziali miRNA identificati e il loro cambiamento di espressione se confrontati in tessuti patologici rispetto al controllo.

In particolare, in fig. 20A sono riportati i 75 sncRNA i cui livelli di espressione aumentano o diminuiscono in entrambi i tessuti considerati e per i quali tale andamento è risultato più marcato nei tessuti cancerosi rispetto a quelli iperplastici. Sono risultati, inoltre, 26 i sncRNA differenzialmente espressi sia nei tessuti iperplastici che tumorali rispetto ai tessuti normali ma che non mostravano cambiamenti se messi a confronto con i livelli di espressione nei 2 tessuti patologici (fig.20B). Infine, nell'ultimo gruppo (fig.20C) sono mostrati 41 sncRNA il cui profilo di espressione variava in maniera significativa rispetto al tessuto normale solo in quello canceroso e non in quello iperplastico.

È stata così definita una "signature" di sncRNA coinvolti nella carcinogenesi endometriale, ed in particolare sono stati individuati sia i sncRNA specificamente deregolati nei campioni tumorali sia i sncRNA i cui livelli di espressione cambiano allo stesso modo nel tessuto iperplastico e tumorale rispetto al normale, facendo ipotizzare che tali piccoli RNA non codificanti siano implicati sia nello sviluppo di uno stadio di pre-cancerosi (come l'iperplasia) sia nella progressione tumorale.

Sono stati caratterizzati, inoltre, i sncRNA la cui variazione di espressione si verifica già nello stadio iperplastico per poi essere più rilevante nel tessuto neoplastico, a dimostrazione del fatto che nello sviluppo di un tumore, non solo di tipo endometriale, i livelli di sovra o sotto-espressione di specifici sncRNA possono essere considerati

parte dei meccanismi molecolari e patologici che determinano il passaggio da una condizione pre-tumorale ad una tumorale vera e propria.

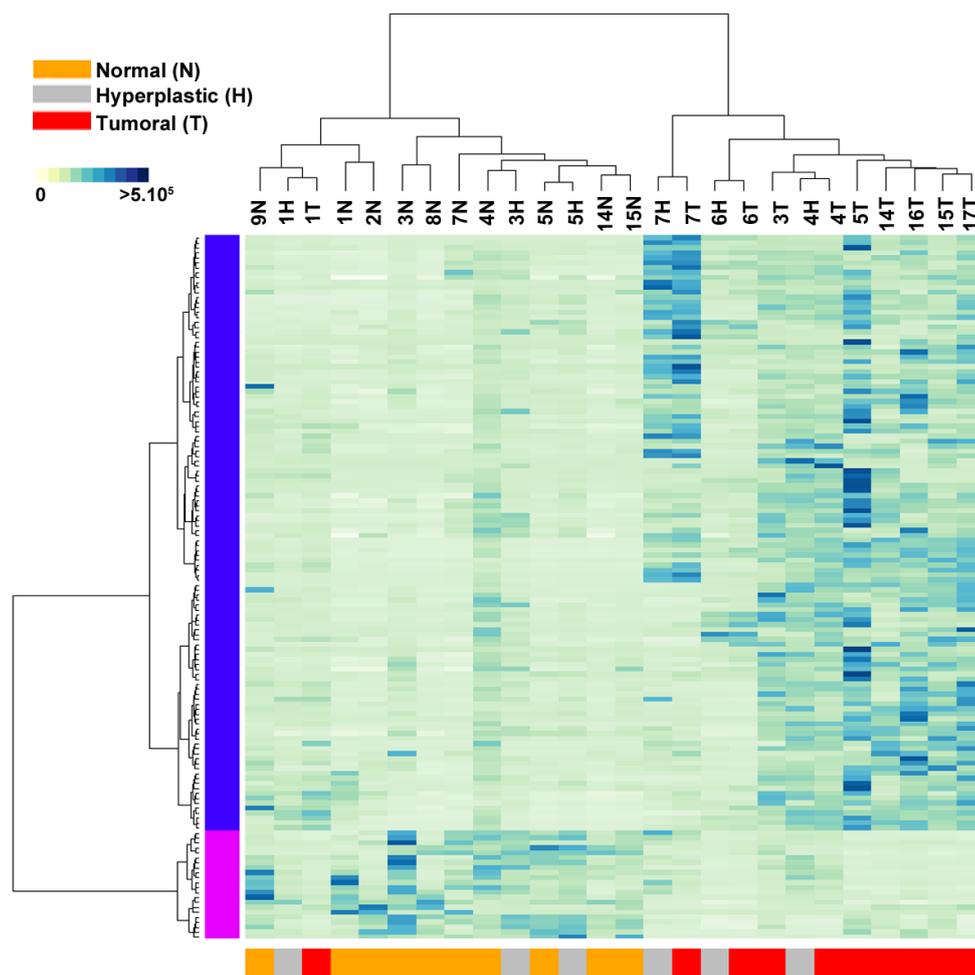


Figura 19. Identificazione della sncRNA “signature” coinvolta nella carcinogenesi endometriale. Analisi di *clustering* gerarchico effettuata mediante il test di Kruskal-Wallis considerando i valori di espressione (RPM) dei 142 sncRNA che discriminano il tessuto tumorale da quello normale.

3.3.4 Analisi funzionale dei *pathway* cellulari influenzati dai sncRNA coinvolti nella carcinogenesi endometriale

Al fine di identificare gli mRNA bersaglio dei sncRNA coinvolti nella carcinogenesi endometriale, mediante *microarray* è stato analizzato il trascrittoma delle biopsie di 5

pazienti di cui erano disponibili tessuto normale, iperplastico e tumorale, come descritto in Materiali e Metodi.

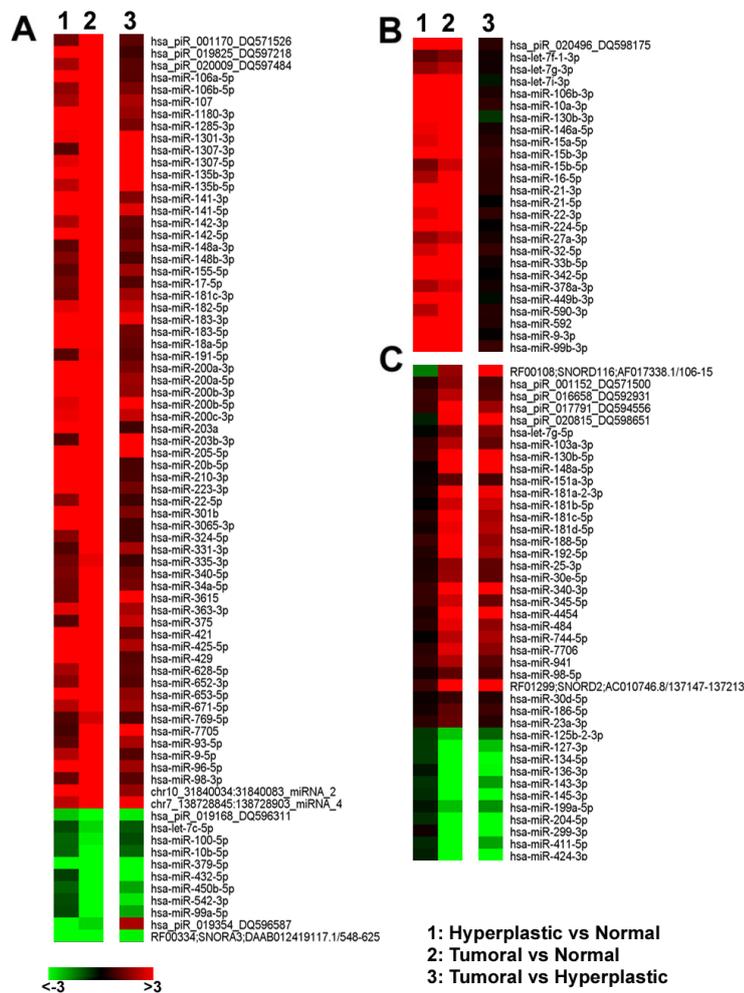


Figura 20. Analisi differenziale dei snRNA appartenenti alla “signature”. L’heatmap mostra i risultati di un’analisi di espressione differenziale condotta sui 142 snRNA coinvolti nella trasformazione tumorale endometriale ed ottenuta confrontando i livelli di espressione nel tessuto iperplastico rispetto al normale (1), nel tessuto tumorale rispetto al normale (2) e nel tessuto tumorale rispetto all’iperplastico (3).

Dai dati ottenuti è emerso che di circa 18.500 trascritti espressi in maniera significativa (*detection p-value* ≤ 0.05), 302 e 452 sono i mRNA che nella stessa paziente sono differenzialmente espressi nel tessuto iperplastico e tumorale rispetto al normale, rispettivamente.

L’analisi funzionale di questi trascritti i cui livelli di espressione sono alterati nei tessuti cancerosi ha rivelato che essi codificano per proteine coinvolte in numerosi processi

cellulari, compresa la proliferazione, la sopravvivenza e il differenziamento cellulare, la migrazione e l'adesione cellula-cellula. In particolare, di interesse sono risultati i trascritti codificanti per PEG3 (*paternally espresse 3*, PW1) e SOCS2 (*suppressor of cytokine signaling 2*, STAT12), per i quali si verifica una riduzione dei livelli di espressione sia nello stadio iperplastico che in quello tumorale.

Molti studi dimostrano che PEG3 potrebbe funzionare come soppressore tumorale nel *pathway* di apoptosi mediato da p53/c-myc e nel *pathway* di segnalazione di Wnt legando la β -catenina, di cui promuove la degradazione, al proteasoma in maniera p53/Siah1-dipendente e GSK3beta-indipendente (Jiang *et al.*, 2010; Relaix *et al.*, 2000). PEG3 è sotto-espresso nel glioma e nel cancro alle ovaie, alla mammella e in altri tipi di cancro che colpiscono il sistema riproduttivo femminile (Kohda *et al.*, 2001; Risinger *et al.*, 2003; Feng *et al.*, 2008; Dowdy *et al.*, 2006).

Allo stesso modo, anche SOCS2 agisce da soppressore tumorale ed è coinvolta principalmente nel *pathway* di segnalazione JAK/Stat, la cui deregolazione è spesso associata alla progressione tumorale (Qiu *et al.*, 2013; Croker *et al.*, 2008).

Tra i trascritti sovra-espresi, inoltre, ritroviamo HOXB6 e HOXB7; si tratta di fattori di trascrizione che legando il DNA grazie ad un caratteristico dominio definito omeodominio sono tra i principali regolatori dell'identità cellulare durante lo sviluppo embrionale. Un'aberrante espressione dei geni HOX sembra mediare l'oncogenesi in molti tipi di cancro umani, compresi epatocarcinoma, cancro alle ovaie e leucemia mieloide acuta, in quanto coinvolti nei processi di inibizione dell'apoptosi, di riparazione del DNA e di stimolazione della motilità cellulare (Rice *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2006).

Al fine di conoscere il ruolo biologico e funzionale dei sncRNA coinvolti nella progressione tumorale endometriale, è stata fatta un'analisi predittiva *in silico* dei bersagli putativi e successivamente i risultati sono stati combinati con i dati ottenuti dalle analisi dei profili di espressione genica usando il *tool* IPA, come descritto in Materiali e Metodi. Tale analisi ha portato all'identificazione di 526 mRNA bersaglio, di cui 65 differenzialmente espressi nei tessuti iperplastici e/o tumorali ($FC \leq -1.5$ e ≥ 1.5 , *p-value* 0.001). Molti *pathway* e processi cellulari sono risultati essere potenzialmente influenzati da questi miRNA, compreso lo sviluppo cellulare, la crescita e la proliferazione e le vie di segnalazione di TGF- β , ERK/MAPK e Wnt/ β -catenina, il cui *network* è rappresentato in fig.21.

La ricerca dei *target* putativi dei piRNA identificati è stata effettuata applicando un metodo basato sulla complementarità di sequenza che consente la predizione di interazioni RNA-RNA rilevanti biologicamente (Rizzo *et al.*, 2014). In questo modo sono stati predetti 1526 mRNA bersaglio, di cui 170 differenzialmente espressi nei tessuti iperplastici e/o tumorali ($FC \leq -1.5$ e ≥ 1.5 , *p-value* 0.001). Anche in questo caso le analisi funzionali dei trascritti hanno mostrato il loro coinvolgimento in processi correlati alla carcinogenesi, tra cui crescita e proliferazione cellulare, segnalazione cellula-cellula, ciclo cellulare e replicazione del DNA e di *pathway* di segnalazione intracellulare, compreso quello di Wnt/ β -catenina.

Per quanto concerne questo *pathway*, riportato in fig.21, è interessante notare che ben 6 sncRNA risultati sovra-espresi (piR_020496_DQ598175, miR-103-3p, miR-155-5p, miR-16-5p, miR-17-5p e il potenziale nuovo miR-4) possono modulare l'espressione di un comune *target* down-regolato ovvero TLE4 (*transducin-like enhancer of split 4*), un corepressore trascrizionale che lega numerosi fattori di trascrizione attivi in questa via cellulare.

Allo stesso modo, PEG3, la cui espressione è fortemente ridotta sia nel tessuto iperplastico che in quello tumorale, è bersaglio molecolare di 9 miRNA della "signature" up-regolati, come miR-186-5p, miR-205-5p, miR-181a-5p, miR-9-5p, miR-141-3p, miR-155-5p e miR-135a-5p.

I risultati ottenuti suggeriscono che i miRNA e i piRNA possono agire sinergicamente nel modulare gli stessi pathway di segnalazione intracellulari alla base dello sviluppo e della progressione tumorale.

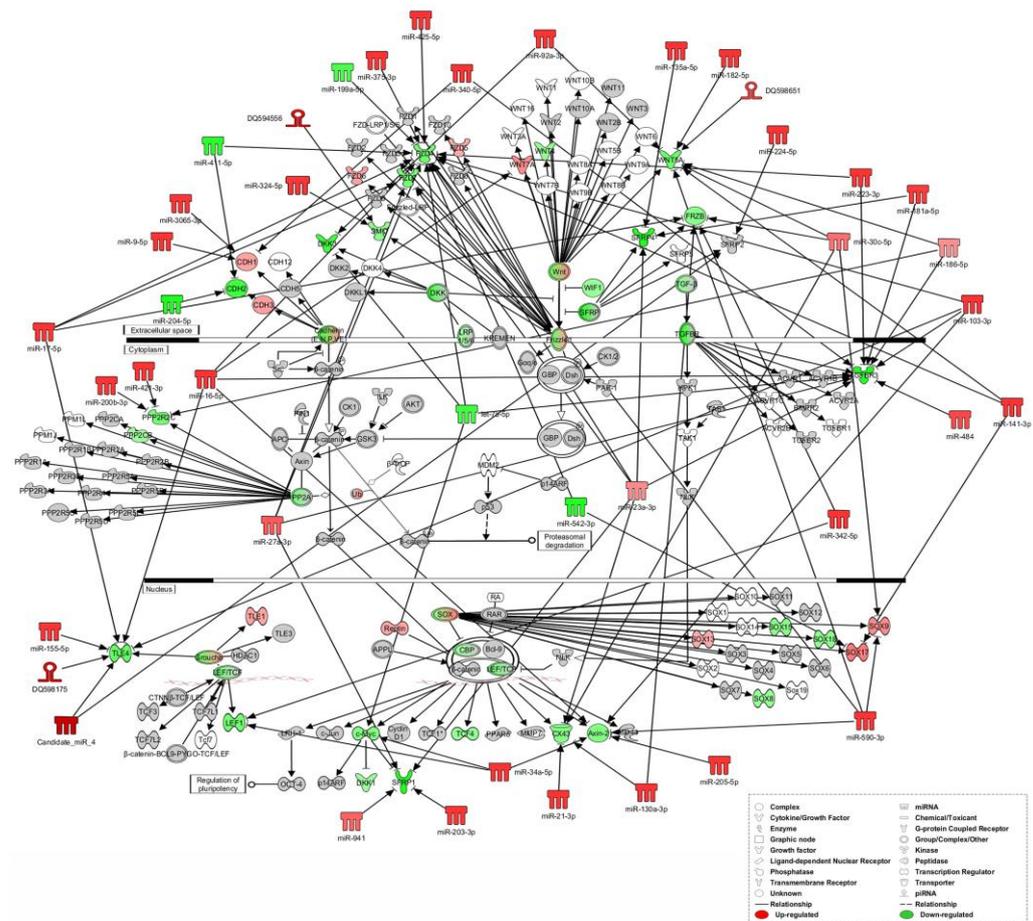


Figura 21. IPA del signaling Wnt/β-catenina. Il network mostra i sncRNA della "signature" regolati nel tessuto tumorale rispetto al normale e i loro target molecolari coinvolti nella via di segnalazione di Wnt/β-catenina. I sncRNA e i mRNA sono colorati di rosso o di verde se risultano sovra-espressi o sotto-espressi nel tessuto canceroso rispetto al normale rispettivamente (FC ≤ -1.5 e ≥ 1.5, p-value 0.001). La colorazione in grigio indica cambiamenti di espressione non significativi.

4.1 Introduzione

4.1.1 Carcinoma mammario, estrogeni e recettori degli estrogeni

Il carcinoma mammario (CM) è un tumore dell'epitelio della ghiandola mammaria e rappresenta la forma di tumore maligno più frequente nel sesso femminile, con un'incidenza che tende ad aumentare dopo la terza decade di vita, un *plateau* fra i 45 e i 55 anni ed un ulteriore incremento fino ai 60 anni.

I tumori maligni della mammella colpiscono le cellule epiteliali del tessuto ghiandolare e per la maggior parte sono adenocarcinomi che, generalmente, vengono suddivisi in carcinomi in *situ* e carcinomi infiltranti. Essi hanno origine dall'unità duttolo - lobulare terminale (TDLU, *Terminal Duct Lobular Unit*) e, mentre i primi sono caratterizzati dalla proliferazione di elementi epiteliali atipici all'interno dei lobuli e dei dotti senza superamento della loro membrana basale, i secondi rappresentano la forma più avanzata di tumore e si distinguono per la loro capacità di metastatizzare. Si stima che circa l'80% dei tumori alla mammella invasivi sia di tipo duttale infiltrante (Pontieri, 2005).

I fattori di rischio correlati al CM possono essere suddivisi in fattori genetici e fattori ambientali. Alcuni fattori di rischio di tipo genetico sono mutazioni a carico dei geni BRCA1 e BRCA2, responsabili della forma familiare della neoplasia, e mutazioni dei geni TP53, PTEN e ATM (Robbins e Cotran, 2006); i fattori ambientali, invece, includono il regime di vita condotto (abuso di alcool, fumo, elevato consumo di grassi nella dieta), la geografia del territorio, esposizione a radiazioni e ad agenti infettivi, anche se il fattore di maggior rilievo è l'esposizione ad una prolungata stimolazione estrogenica sia endogena che esogena.

Il CM risulta essere nel 70% dei casi un tumore di tipo ormono-responsivo in quanto le cellule neoplastiche, esprimendo elevati livelli di recettori degli estrogeni (RE), sono in grado di rispondere agli stimoli proliferativi indotti da questi ormoni.

Gli estrogeni sono ormoni sessuali responsabili dei caratteri secondari femminili che appartengono alla famiglia degli ormoni steroidei derivati dal colesterolo e prodotti principalmente dai follicoli ovarici, dalle cellule della teca interna e dalla placenta durante la gravidanza; tuttavia, alcuni estrogeni sono prodotti in piccole quantità anche in altri organi e tessuti, come il fegato, il tessuto adiposo e le ghiandole surrenali, i quali rappresentano, dunque, l'unica fonte di produzione nell'uomo e nelle donne in menopausa (Nelson *et al.*, 2001).

Gli estrogeni sono, dunque, potenti promotori tumorali nella ghiandola mammaria, perché hanno la capacità di indurre la crescita delle cellule epiteliali, consentendo lo sviluppo e l'accrescimento della massa tumorale; in particolare il 17β -estradiolo (E_2), il più importante estrogeno dal menarca alla menopausa, esercita un'azione mitogena sulle cellule della ghiandola mammaria.

Nelle normali condizioni fisiologiche le cellule della ghiandola mammaria rispondono allo stimolo estrogenico con un incremento della proliferazione; in particolare, E_2 stimola crescita e differenziamento dei dotti galattofori che, a partire dalla pubertà, aumentano in numero e in ramificazioni, con conseguente sviluppo di una mammella adulta. L'azione degli estrogeni si inquadra in un complesso meccanismo di regolazione endocrina e paracrina in cui intervengono altri ormoni (progesterone, prolattina, GH, ACTH, ormoni tiroidei) e fattori di crescita (EGF, IGF-I e II, TGF- α e - β), che inducono la proliferazione e il differenziamento cellulare, regolando l'espressione e l'attivazione di componenti "chiave" del ciclo cellulare.

I meccanismi attraverso cui si esplica l'azione trofica e proliferativa degli estrogeni sul CM consistono nell'attivazione trascrizionale di geni critici del ciclo cellulare (come la ciclina D1) o di fattori trascrizionali con un ruolo importante nello stimolare la riproduzione cellulare (come i fattori di trascrizione c-Fos, c-Jun e c-Myc) e l'innescare di vie di trasduzione del segnale per la proliferazione.

Nelle normali condizioni fisiologiche, le cellule duttali si trovano dunque in uno stato di ormono-sensibilità, ossia rispondono allo stimolo estrogenico ma non muoiono in assenza di esso, in quanto, gli estrogeni, pur attivando eventi metabolici importanti, non sono indispensabili per la sopravvivenza cellulare.

Nelle cellule neoplastiche, invece, si verificano una serie di complesse ed ancora non del tutto chiare alterazioni dei processi di crescita e di differenziamento che comportano un cambiamento nella risposta, stabilendo una ormono-dipendenza, che consiste nell'incapacità del tumore di crescere in assenza dello stimolo trofico ormonale (Bonadonna *et al.*, 1999). In esperimenti condotti *in vitro* su cellule di CM, la deprivazione estrogenica determina un arresto della proliferazione in fase G1, del ciclo cellulare e, parallelamente, un aumento dei fenomeni di morte cellulare ed apoptosi. La ri-esposizione delle cellule ad E₂ suscita, entro 12 ore, una ripresa della proliferazione ed un aumento della percentuale di cellule in fase S (Weisz *et al.*, 1993; Belsito-Petruzzi *et al.*, 2000).

Gli estrogeni esplicano i loro effetti di promozione ed induzione della crescita della ghiandola mammaria attraverso il legame con i RE. I RE appartengono alla superfamiglia dei recettori nucleari (RN), un gruppo di recettori intracellulari che agiscono da fattori di trascrizione ligando-dipendenti. Sono stati individuati e caratterizzati due principali sottotipi recettoriali definiti recettore degli estrogeni alfa (RE α) e recettore degli estrogeni beta (RE β).

Il gene di RE α (ESR1) è localizzato sul cromosoma 6 (6q25.1), è lungo circa 170kb ed è costituito da 8 esoni. Esso codifica per una proteina formata da 595 aa ed un peso molecolare di 66kDa; si tratta di una proteina solubile, termolabile, sensibile all'azione delle proteasi e sottoposta ad un rapido turnover (circa 4 ore), sia nell'utero che nelle cellule di CM MCF7 (Jensen *et al.*, 1972). RE β è codificato dal gene ESR2 formato da 61,2 kb, localizzato sul cromosoma 14 (14q23.2) e costituito anch'esso da 8 esoni. Due regioni promotrici (0K e 0N) regolano la trascrizione del gene. La proteina nell'uomo è lunga 530 aa e pesa 58 kDa. RE β è espresso ad alti livelli nelle ovaie, nei testicoli, prostata, mammella, ghiandole salivari, endotelio vascolare, muscolatura liscia e sistema nervoso centrale (Koehler *et al.*, 2005).

I due recettori steroidei, attivati dal legame con l'ormone, agiscono attraverso due possibili meccanismi d'azione: la via genomica e la via non genomica. Nel primo meccanismo i RE agiscono legando direttamente il DNA e modulando l'espressione dei geni E₂-responsivi; nel secondo, invece, il complesso recettore-ligando non interagisce con il DNA, ma induce risposte cellulari rapide e transitorie attivando effettori di diverse vie di trasduzione del segnale. Nonostante la via genomica e quella non genomica agiscano in modo differente, esistono varie evidenze di un *cross-talk* tra di esse: numerosi RN possono essere attivati in maniera ligando-indipendente mediante fattori di crescita, citochine e neurotrasmettitori. Queste molecole, in seguito all'interazione con i propri recettori di membrana, innescano cascate di trasduzione del segnale che promuovono la fosforilazione, l'attivazione e il legame dei RE al DNA.

In particolare, la via genomica (illustrata in fig.22) rappresenta la via classica di attivazione recettoriale attraverso la quale si ha la regolazione dei geni bersaglio degli estrogeni. Tali ormoni in circolo, grazie alla loro natura idrofobica, diffondono

attraverso la membrana plasmatica in modo da entrare nella cellula e legare i recettori citoplasmatici. Il legame di tipo cooperativo di E_2 al recettore ne provoca un cambiamento conformazionale a cui segue poi la traslocazione nel nucleo, dove il RE, in forma dimerica, agisce da fattore trascrizionale riconoscendo e legando il DNA in corrispondenza delle sequenze ERE (*ERE, estrogen response element*).

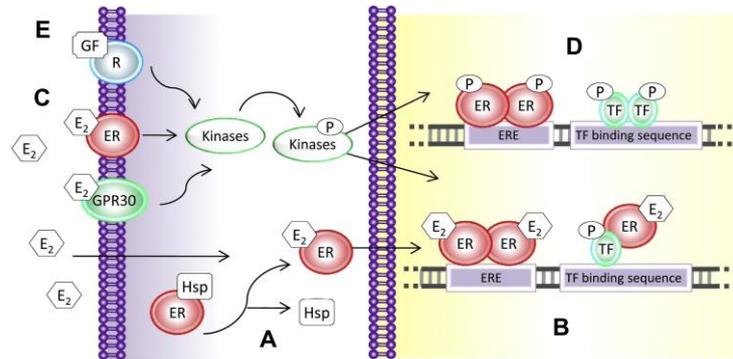


Figura 22. Meccanismi di azione degli estrogeni. A-B) Schematizzazione della via genomica. E_2 legando i RE ne induce la dissociazione dalle *heat shock protein* (Hsp), la dimerizzazione e la traslocazione nel nucleo. I complessi E_2 -RE dimerizzano e possono legare il DNA direttamente in corrispondenza delle sequenze ERE (*Estrogen Response Element*) o indirettamente mediante il legame con altri fattori di trascrizione in corrispondenza dei promotori dei geni regolati. **C-D)** I complessi di membrana E_2 -RE ed E_2 -GPR30 attivano la cascata delle proteine chinasi che regolano l'espressione genica attraverso la fosforilazione e l'attivazione dei fattori di trascrizione (TF). **E)** Fattori di crescita attivano la cascata delle proteine chinasi che determina fosforilazione e attivazione dei REs anche in assenza di E_2 . (da Gambino YP *et al.*, 2011).

Le ERE sono sequenze consenso palindromiche di tredici paia di basi disposte in modo da formare due sequenze di cinque coppie di basi ripetute ed invertite (IR), separate da uno spazio di tre coppie di basi non specifiche (n):



Le sequenze ERE funzionali si trovano nei promotori di geni umani codificanti proteine quali pS2, ossitocina, c-Fos, c-Myc, lactoferrina, prolattina, catepsina D e proteine del sistema del complemento. Tuttavia, tali elementi funzionali in alcuni geni sono localizzati anche lontano dal sito di inizio della trascrizione, agendo, in questo caso, da *enhancer* (Cicatiello *et al.*, 2010). Nel genoma umano molti geni estrogeno-responsivi non contengono una sequenza ERE perfettamente palindromica e l'affinità di legame del RE al DNA è ridotta dalla presenza di mutazioni.

La regolazione dei geni bersaglio degli estrogeni può avvenire mediante due meccanismi genomici: il primo implica il legame diretto del recettore alle sequenze ERE mentre il secondo, anche noto come meccanismo di *tethering*, prevede l'associazione indiretta del RE con i promotori dei geni tramite interazione con altri fattori di trascrizione come AP-1, E2F, SP1 e NFkB (Nilsson *et al.*, 2001). Tale meccanismo indiretto spiegherebbe, almeno in parte, la regolazione trascrizionale di

quei geni che risultano regolati dagli estrogeni ma che non hanno un ERE nelle vicinanze.

Nonostante i due recettori agiscano secondo meccanismi molecolari condivisi, è ormai noto che RE β possiede funzioni biologiche differenti da RE α . Questo è dimostrato sia dai diversi profili di espressione genica associati a ciascuno dei recettori, sia dal fatto che i topi *knock out* per RE β (RE β KO) mostrano un fenotipo molto differente da quelli privi di RE α (RE α KO) (Harris, 2007). Infatti, sebbene RE α e RE β condividano un'elevata omologia di sequenza a livello dei domini di legame al DNA (DNA binding domain, DBD) e al ligando (ligand binding domain, LBD), mostrano una differente attività di regolazione trascrizionale. Questi dati avvalorano l'ipotesi che ciascuno dei due sottotipi recettoriali, agendo insieme a specifici cofattori nucleari in complessi multiproteici, svolge un ruolo peculiare nel controllo dell'espressione genica.

4.1.2 Ruolo del recettore degli estrogeni β nel carcinoma mammario

RE β è espresso in cellule mammarie epiteliali normali, nonché in una frazione significativa di tumori della mammella RE α -positivi e RE α -negativi, con diminuzione dei livelli di espressione nel cancro rispetto ai tumori benigni o ai tessuti normali, suggerendo che i livelli di espressione di RE β nelle cellule cancerose potrebbe rappresentare una fase critica nella progressione del tumore estrogeno-dipendente. Il ruolo di RE β come soppressore tumorale è inoltre supportato da diversi studi epidemiologici che dimostrano come la perdita di tale recettore sia associata ad una prognosi peggiore della malattia (Roger *et al.*, 2001). Diverse ipotesi suggeriscono che il silenziamento trascrizionale di RE β , dovuto ad un'ipermetilazione del suo promotore, determini la progressione tumorale, fenomeno osservato non solo nel carcinoma mammario ma anche in altre forme di cancro ormono-responsive (Zhu *et al.*, 2004). In presenza di E₂, RE β è in grado di inibire la proliferazione delle cellule di CM, interferendo con la trascrizione di geni anti-apoptotici e di geni coinvolti nel ciclo cellulare mediata da RE α (Grober *et al.*, 2011; Paris *et al.*, 2012). Paris *et al.* hanno dimostrato, inoltre, che RE β controlla la sintesi, la maturazione e i livelli basali di un numero significativo di miRNA nelle cellule di CM interferendo con l'attività di RE α o agendo autonomamente. Ciò determina effetti sul miRNoma e sull'attività di soppressore tumorale del recettore che potrebbero spiegare perchè la sua presenza è correlata con un fenotipo meno aggressivo della malattia.

Inoltre, diversamente da RE α che è principalmente inattivo in assenza di estrogeni, RE β è in grado di regolare l'espressione genica anche in assenza di ligandi steroidei; esso, infatti, come recettore non stimolato (RE β *unliganded*) può traslocare nel nucleo, reclutare co-regolatori trascrizionali e modulare l'attività di espressione genica. Recenti studi di profili di espressione genica effettuati su cellule di osteosarcoma hanno dimostrato, infatti, che RE β costitutivo è in grado di aumentare o diminuire i livelli di espressione di specifici geni bersaglio. Sono state infatti identificate tre distinte classi di geni bersaglio: geni di classe I regolati da RE β costitutivo, geni di classe II regolati solo in presenza di E₂ e geni di classe III la cui regolazione è mediata dalla forma costitutiva di RE β ma è potenziata dall'azione ormonale. Questi multipli meccanismi di regolazione genica sembrano essere dovuti ai diversi fattori trascrizionali che si localizzano in stretta prossimità dei siti di legame di RE β e ai co-fattori e modulatori che interagiscono con esso (Vivar *et al.*, 2010).

In studi condotti su cloni ottenuti da cellule di CM MCF-7 ed esperimenti stabilmente RE β fuso alla TAP-*tag* all'estremità N-terminale (Nt-RE β) o C-terminale (Ct-RE β) è stata analizzata l'attività costitutiva del recettore e in che modo essa potesse controllare una o più funzioni cellulari (Nassa *et al.*, 2014). I risultati ottenuti hanno dimostrato che la presenza di RE β determina una riduzione della cinetica del ciclo cellulare, in maniera concorde con le evidenze sperimentali in cui l'espressione di RE β è associata ad un arresto in fase G1 delle cellule in molte tipologie di cancro (Hartman *et al.*, 2009). Questo risultato suggerisce un'attività costitutiva di RE β nel determinare l'inibizione della crescita di cellule di CM, indipendente dalla documentata attività anti-proliferativa estrogeno-dipendente mirata soprattutto a bilanciare l'azione mitogenica di RE α (Grober *et al.*, 2011; Paris *et al.*, 2012). Una migliore caratterizzazione dei processi cellulari e dei meccanismi molecolari influenzati da RE β costitutivo in cellule CM ormono-responsive diventa importante quando si considera che i livelli di estrogeni si riducono notevolmente durante la menopausa ed in seguito a terapie endocrine basate sull'uso di inibitori dell'aromatasi.

4.2 Scopo del lavoro

Studi recenti dimostrano che RE β in assenza di stimolo ormonale è equidistribuito nel citosol e nel nucleo, lasciando ipotizzare che vi sia un meccanismo di *shuttling* del recettore indipendente da estrogeni tra i due compartimenti cellulari. Nella sua forma "libera da ligando", tale recettore è in grado di inibire la crescita cellulare e di arrestare le cellule nella fase G1 del ciclo cellulare (Nassa *et al.*, 2014). Il primo obiettivo di questo studio è stato finalizzato ad investigare gli effetti dell'attività costitutiva di RE β sull'espressione genica e sul profilo di espressione dei miRNA in cellule di CM MCF-7. Studi di proteomica quantitativa hanno identificato gli interattori molecolari del recettore costitutivo in MCF-7, tra cui di particolare interesse è risultata la proteina AGO2, dato il suo coinvolgimento nella biogenesi e nei meccanismi d'azione dei miRNA. Secondo obiettivo del lavoro è stato, quindi, validare e stabilire il ruolo funzionale dell'interazione di RE β con AGO2 in cellule di CM in assenza di stimolo estrogenico.

4.3 Risultati e discussione

4.3.1 Effetti dell'attività di RE β costitutivo sull'espressione genica

A partire dalle evidenze sperimentali che dimostrano l'esistenza di un'attività costitutiva di RE β in grado di inibire la crescita in cellule di CM MCF7, è stato investigato il ruolo trascrizionale di tale recettore in condizioni di assenza di stimolo estrogenico. Lo studio è stato condotto su cellule MCF7 *wild type* (wt) e sui cloni stabili esperimenti Ct-RE β e Nt-RE β , precedentemente generati nel Laboratorio di Medicina Molecolare e Genomica, dove ho svolto il mio progetto di Dottorato. Le cellule sono state cresciute in un mezzo di coltura privo di estrogeni e di fattori estrogeno-simili e sottoposte ad estrazione del RNA e ad RNA-seq come descritto in Materiali e Metodi. Sono stati identificati 15470 e 16115 geni significativamente espressi nei cloni Ct-RE β e Nt-RE β rispettivamente. I dati ottenuti dai due gruppi di

geni sono stati confrontati e sono stati considerati solo quelli statisticamente significativi con un *p-value* aggiustato ≤ 0.05 ; in questo modo 6951 geni sono risultati comunemente espressi in entrambi i cloni utilizzati. Successivamente l'analisi differenziale condotta sui livelli di espressione di tali trascritti ha rivelato che 958 sono sovra-espressi e 1462 sotto-espressi in almeno uno dei cloni RE β positivi rispetto alle linee cellulari di controllo MCF-7 RE β negative ($|FC| \geq 1.5$ e *False Discovery Rate* ≤ 0.05). Effettuando analisi funzionali *in silico*, inoltre, è emerso che i geni modulati dall'attività costitutiva di RE β sono coinvolti nella crescita e nella proliferazione cellulare, nel movimento cellulare, nella segnalazione cellula-cellula, dei disordini del sistema endocrino oltre che nel cancro (fig. 23).

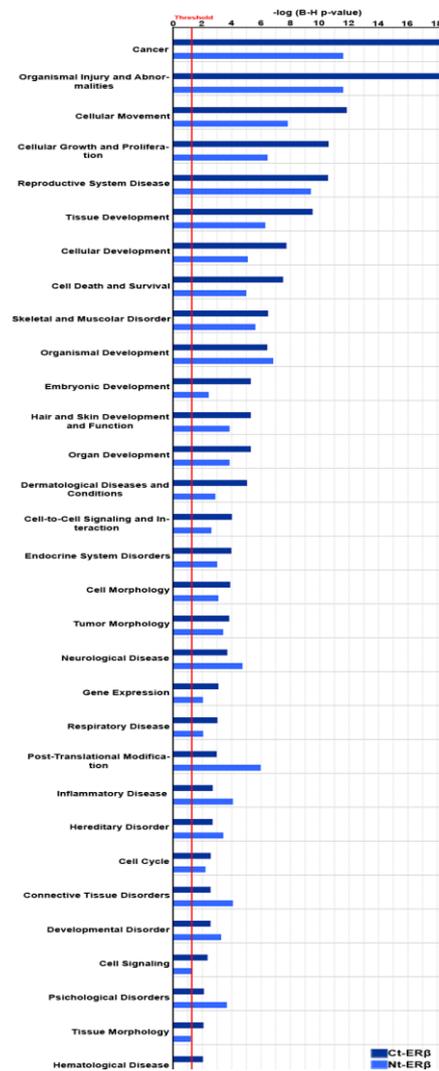


Figura 23. Analisi funzionale dei trascritti modulati dall'attività costitutiva di RE β . Annotazione funzionale condotta mediante *Ingenuity Comparison Analysis* sui trascritti differenzialmente espressi nelle cellule MCF-7 esprimenti Ct-RE β o Nt-RE β ($|FC| \geq 1.5$ e *FDR* ≤ 0.05). La barra rossa indica il valore soglia (threshold) di *p-value*.

Al fine di ottenere una visione più ampia del ruolo di RE β costitutivo nella regolazione trascrizionale dell'espressione genica, mediante immunoprecipitazione della cromatina seguita dal sequenziamento massivo parallelo (ChIP-seq) sono stati mappati *in vivo* i siti di legame di RE β al genoma di cellule MCF-7 in assenza di stimolo estrogenico.

L'immunoprecipitazione di RE β e del DNA ad esso legato è stata effettuata nei cloni Ct-RE β e nelle linee MCF-7 wt di controllo come descritto in Materiali e Metodi. Le librerie di ChIP-seq sono state sequenziate su piattaforma Illumina HiSeq2500 e le sequenze ottenute sono state allineate al genoma umano di riferimento. Dalle analisi condotte con il software HOMER sono stati identificati 16407 siti di legame di RE β costitutivo al genoma, i quali sono risultati arricchiti in seguito ad immunoprecipitazione del recettore nel clone RE β positivo sia rispetto al campione di partenza non immunoprecipitato (*input*) sia rispetto al controllo MCF-7 wt (fig. 24).

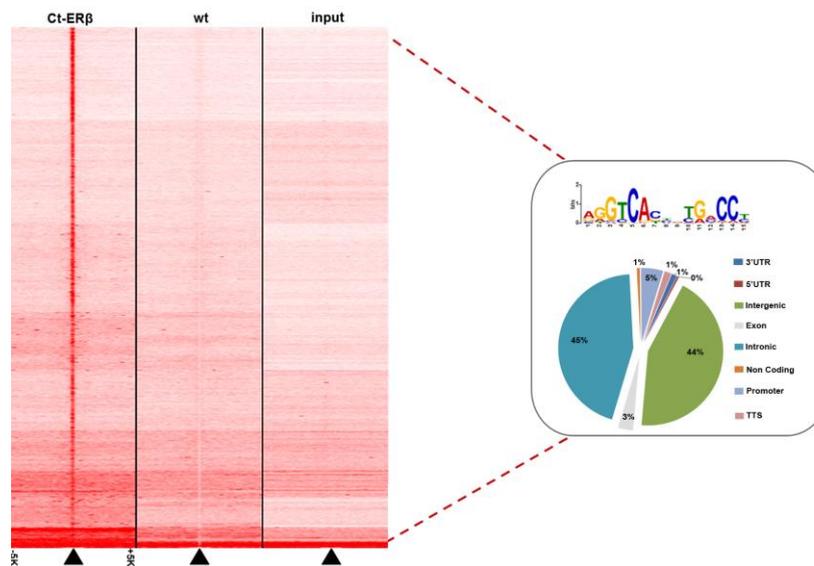


Figura 24. Mappatura globale *in vivo* dei siti di legame di RE β al genoma in assenza di stimolo ormonale. Nell'*heatmap* sono mostrati i siti di legame di RE β al DNA arricchiti rispetto alle cellule MCF-7 di controllo e all'*input*. Il riquadro a destra mostra il *weblogo* del motivo corrispondente alla sequenza *consensus* ERE, che è risultata essere tra quelle maggiormente rappresentate. Il grafico a torta indica la distribuzione in percentuale dei siti identificati lungo il genoma.

Inoltre, analisi dettagliate hanno rivelato che 250 siti tra quelli identificati (il 5% del totale) è localizzata all'interno di regioni promotrici, calcolate considerando 1000 basi a monte e 100 basi a valle del sito di inizio della trascrizione (TSS), in accordo con le linee guida del software HOMER. La restante parte dei siti identificati si distribuiscono per la maggior parte in regioni introniche (45%) o intergeniche (44%) ed in piccole percentuali anche all'interno di esoni e regioni non codificanti. Analisi di sequenza per la ricerca di motivi conservati condotte con il tool *MatInspector* della piattaforma *Genomatix* hanno dimostrato che la matrice ERE (*consensus*: GGTCAnnnTGACC) è

una delle più rappresentate (fig.24), indicando che RE β riconosce specificamente questa sequenza palindromica anche in assenza di stimolo estrogenico.

Per stabilire le correlazioni funzionali tra i profili di espressione genica e i siti di legame di RE β al genoma, è stato effettuato un confronto dei dati ottenuti dal RNA-Seq con i dati di ChIP-seq. Da tale analisi è emerso che RE β è in grado di legare costitutivamente la regione promotrice di 135 geni differenzialmente espressi (fold-change ≤ -1.5 e ≥ 1.5), definiti *target* primati di RE β ligando-indipendenti (tab.3).

Gene	FC	FDR	Gene	FC	FDR	Gene	FC	FDR
SLC30A8	124,31	0,00000	CASQ2	1,66	0,02089	SUSD1	-1,65	0,00000
PDZK1	6,57	0,00000	HUS1	1,66	0,00000	GCOM1	-1,65	0,00001
IL20	6,49	0,00000	CHD1L	1,66	0,00000	GPR56	-1,65	0,00000
C14orf132	4,68	0,00000	SLC25A30	1,66	0,00000	PLEC	-1,72	0,00000
FOXP2	4,10	0,00000	HLA-C	1,64	0,00000	NAV1	-1,76	0,00035
P2RX7	3,87	0,01709	IDI1	1,64	0,00000	PRSS22	-1,79	0,00000
CAPN8	3,71	0,00000	SERTAD2	1,63	0,00000	SMAGP	-1,79	0,00000
PPFIA4	3,19	0,00000	MOCS2	1,61	0,00000	PCTP	-1,80	0,00000
TTC39B	2,99	0,00000	CSRP1	1,59	0,00000	NPR3	-1,84	0,00000
USH1G	2,92	0,04057	ENO1	1,59	0,00000	NRIP1	-1,84	0,00000
MUC5B	2,78	0,00000	SPTSSB	1,59	0,00000	NFASC	-1,88	0,04090
PHYH	2,57	0,00000	ATRIP	1,58	0,00000	WISP2	-1,89	0,00000
ACSS1	2,53	0,00000	TRIM56	1,58	0,00000	GATA2	-1,96	0,00000
C1QTNF9B-AS1	2,50	0,01579	SLC39A4	1,58	0,00000	NME2	-1,96	0,00000
ONECUT1	2,47	0,00162	SLC39A4	1,58	0,00000	RRAS	-2,01	0,00000
PPP1R9A	2,27	0,00000	SLC35B2	1,57	0,00000	HMCN1	-2,08	0,00000
TFF1	2,26	0,00000	MTMR11	1,57	0,00000	RPS6KA2	-2,13	0,00000
TXNIP	2,24	0,00000	TMEM9	1,57	0,00000	BATF	-2,14	0,00000
GOLT1A	2,22	0,00000	TYSND1	1,57	0,00000	SIX2	-2,15	0,03496
C1orf145	2,17	0,00001	MARC1	1,56	0,00000	BCAM	-2,23	0,00000
SLC16A3	2,08	0,00000	FAM46C	1,55	0,00000	TMCC2	-2,24	0,00521
KIAA0040	2,08	0,00000	NECAB3	1,55	0,00000	LRRN2	-2,25	0,00052
PFKFB2	2,07	0,00000	ARHGAP21	1,53	0,00000	TBX2	-2,36	0,00000
NAB2	2,04	0,00000	MAPK8	1,52	0,00000	BCL9L	-2,40	0,00000
CASP7	2,02	0,00000	PLOD2	1,52	0,00000	BASP1	-2,45	0,00000
VGF	1,99	0,00000	ZNF551	1,52	0,00083	BCL3	-2,46	0,00000
TNNI1	1,95	0,00000	SLC45A3	1,51	0,00400	P2RY2	-2,60	0,00000
C10orf35	1,92	0,00000	CCDC88C	1,50	0,00000	SALL4	-2,65	0,00000
ABCA17P	1,91	0,00002	RRBP1	-1,50	0,00000	CYP1B1	-2,67	0,00000
TMPRSS13	1,90	0,00000	GAPDH	-1,50	0,00000	RNF207	-2,67	0,00000
GREB1	1,90	0,00000	SLC16A6	-1,51	0,00000	NCALD	-2,72	0,00000
SLC37A3	1,88	0,00000	SYBU	-1,51	0,02129	JAG1	-2,73	0,00000
GAL	1,84	0,00039	SYBU	-1,51	0,02129	FAM83E	-2,84	0,03019
ZNF219	1,82	0,00000	PTK6	-1,52	0,00000	PLK2	-2,85	0,00000
VAV3	1,82	0,00000	EPN3	-1,52	0,00000	DLG2	-2,99	0,00000
ERG	1,81	0,00091	IL18BP	-1,52	0,00000	CREG2	-3,16	0,00000
DNA2	1,81	0,00000	ZGPAT	-1,53	0,00000	RIPK4	-3,39	0,00000
SQLE	1,78	0,00000	RIN1	-1,55	0,00017	NCAM2	-3,97	0,00000
PRLR	1,78	0,00000	RPL18A	-1,57	0,00000	ADAMTS19	-4,39	0,00000
TTC39C	1,75	0,00000	GPR137	-1,59	0,00000	CNTD2	-4,76	0,00134
FASTKD1	1,75	0,00000	SPATA17	-1,59	0,00000	ANKRD2	-5,17	0,00003
GALNT11	1,69	0,00000	RAVER1	-1,60	0,00000	P2RY6	-5,58	0,00000
GBA	1,67	0,00000	DHX40	-1,62	0,00000	P2RY6	-5,58	0,00000
KCTD3	1,67	0,00000	TGFB2	-1,63	0,00000	ESRRG	-8,11	0,00000
SLC19A2	1,66	0,00000	PITPNM1	-1,64	0,00000	CYP24A1	-12,64	0,00000

Tabella 3. Lista dei *target* primari di RE β ligando-indipendenti.

L'analisi funzionale di questi *target* effettuata con il *software* IPA ha mostrato che uno dei *pathway* più rappresentato è l'apoptosi e che i geni sono coinvolti in *network* funzionali implicati nel cancro della mammella e dell'ovario, come Casp7 (risultato sovra-espresso) e R-Ras (risultato sotto-espresso). Molte sono le evidenze sperimentali a sostegno di un coinvolgimento di questi due geni, e quindi delle proteine per cui essi codificano, nella progressione del tumore della ghiandola mammaria. In particolare, Casp7 è un noto effettore dell'apoptosi la cui attività è stato dimostrato determinare risposta del tumore alla chemioterapia (Madeira et al., 2013). Per ciò che concerne R-Ras, è stata dimostrata la sua diretta implicazione nella promozione della proliferazione estrogeno-indipendente di cellule di CM esprimenti RE α con resistenza acquisita al tamoxifene (Vivar et al., 2010).

4.3.2 Identificazione dei miRNA modulati da RE β costitutivo

Studi hanno evidenziato che i miRNA svolgono un ruolo cruciale nella risposta agli estrogeni mediata dai RE in cellule di CM (Paris et al., 2012) e per tali motivi, è stata investigata la possibilità che RE β potesse influenzare il miRNoma di cellule MCF-7 anche nella sua forma "libera da ligando". A tale scopo, l'RNA è stato estratto dai cloni esprimenti stabilmente RE β (Ct-RE β e Nt-RE β) e dalle cellule di controllo MCF-7 cresciute in condizioni di deprivazione ormonale e le librerie di *small*RNA sono state ottenute come descritto in Materiali e Metodi.

Mediante sequenziamento massivo parallelo sono stati analizzati i cambiamenti nel profilo di espressione dei miRNA indotti globalmente dall'attività estrogeno-indipendente del recettore. I risultati ottenuti mostrano che tra più di 450 miRNA espressi significativamente, 101 sono risultati differenzialmente espressi in entrambi i cloni RE β positivi rispetto al controllo con un FC ≤ -1.3 e ≥ 1.3 ed un *p-value* ≤ 0.05 . Tra questi è stato possibile individuare un gruppo di 83 miRNA regolati allo stesso modo (sia in termini di sovra- che di sotto-espressione) in entrambi i cloni considerati (tab 4).

Al fine di comprendere il significato biologico associato ai cambiamenti del profilo di espressione dei miRNA indotti dalla presenza di RE β , analisi *in silico* effettuate con il *tool* IPA hanno rivelato che essi sono coinvolti nel movimento e nello sviluppo cellulare, nella crescita e nella proliferazione, nella segnalazione e nelle interazioni cellula-cellula, oltre che nella risposta cellulare alle terapie (fig.25).

Osservando in dettaglio il gruppo di 83 miRNA regolati (tab.4), si può riscontrare, ad esempio, che RE β aumenta i livelli di espressione di miRNA notoriamente espressi con bassi livelli in molti tipi di tumore compresi let-7d e miR-125a e riduce al tempo stesso i livelli di espressione di alcuni miRNA appartenenti alla famiglia miR-200, coinvolti nella transizione epitelio-mesenchimale (EMT) oltre che nello sviluppo e nella progressione tumorale.

I risultati così ottenuti, insieme alle evidenze sperimentali già note, suggeriscono che tale recettore (quando presente) sembra agire da oncosoppressore anche in assenza di estrogeni, condizione che si verifica in donne in post-menopausa e per le quali l'incidenza del CM risulta tuttavia elevata nonostante il calo fisiologico di tali ormoni.

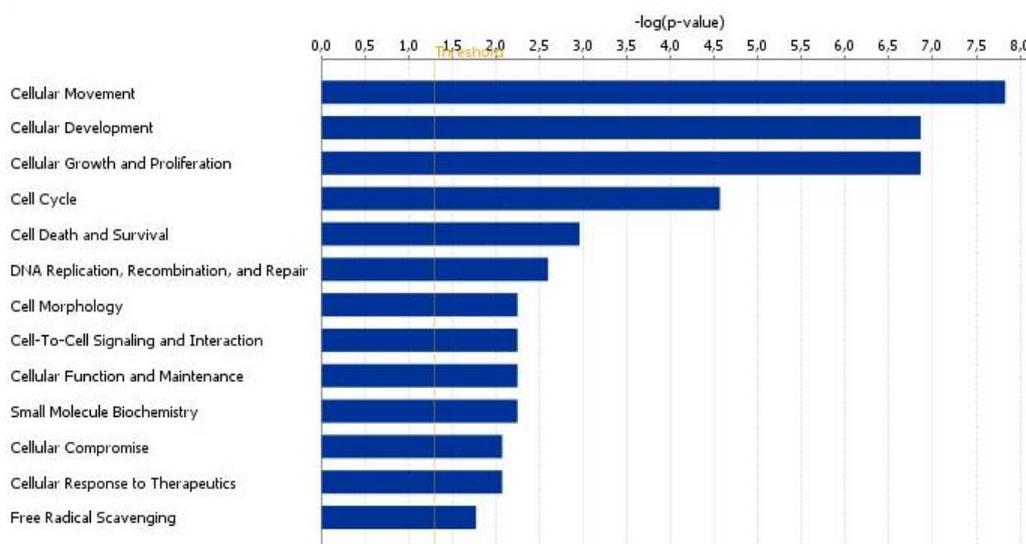


Figura 25. Analisi funzionale dei miRNA regolati da RE β . L'analisi funzionale eseguita con IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*) dei 83 miRNA comunemente regolati da RE β nei cloni Ct-RE β ed Nt-RE β ($|FC| \geq 1.3$; $p\text{-value} \leq 0.05$). La barra arancione indica il valore soglia di $p\text{-value}$.

4.3.3 Ruolo del complesso RE β /AGO2 in meccanismi di regolazione post-trascrizionali dell'espressione genica mediati da miRNA

Esperimenti di *Tandem Affinity Purification* (TAP) accoppiati a spettrometria di massa (MS), condotti in parallelo nell'ambito di altre attività di ricerca del Laboratorio di Medicina Molecolare e Genomica, hanno permesso di identificare gli interattori molecolari di RE β costitutivo in cellule di CM MCF-7. Di particolare interesse è risultata la proteina AGO2, dato che essa rappresenta il centro catalitico del complesso RISC, coinvolto nella biogenesi e nella maturazione dei miRNA e, al tempo stesso, nella regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica da essi mediata.

Partendo da tali evidenze sperimentali, è stata avanzata l'ipotesi che RE β costitutivo possa associarsi ad AGO2 e con esso essere coinvolto nella regolazione miRNA-mediata di specifici mRNA bersaglio.

In primo luogo è stata validata l'interazione RE β /AGO2 mediante esperimenti di co-immunoprecipitazione e saggio *in vivo* PLA (*Proximity Ligation Assay*).

Al fine di confermare l'interazione tramite co-immunoprecipitazione delle due proteine, sono stati scelti cloni cellulari precedentemente ottenuti e caratterizzati ed esperimenti stabilmente il gene RE β fuso alla *tag Myc-Flag*, la cui espressione è indotta dal trattamento con l'antibiotico doxiciclina mediante sistema *Tet-on*. Come riportato in Materiali e Metodi, tali cloni sono stati mantenuti in coltura per 5 giorni in condizioni di deprivazione ormonale e l'espressione di *MycFlag-RE β* è stata indotta per 24h con doxiciclina.

miRNA	Ct-RE β FC	Ct-RE β p-value	Nt-RE β FC	Nt-RE β p-value
hsa-miR-10a-5p	-33,00	0,0000	-4,79	0,0000
hsa-miR-449a	-18,91	0,0000	-5,81	0,0000
hsa-miR-9-3p	-8,09	0,0001	-2,17	0,0199
hsa-miR-3174	-7,95	0,0006	-16,32	0,0000
hsa-miR-519a-3p	-7,35	0,0119	-8,64	0,0007
hsa-miR-545-5p	-4,57	0,0076	-4,13	0,0030
hsa-miR-326	-3,97	0,0000	-1,43	0,0000
hsa-miR-10b-5p	-3,40	0,0000	-1,76	0,0000
hsa-miR-184	-3,27	0,0000	-6,51	0,0000
hsa-miR-20b-5p	-3,20	0,0026	-2,24	0,0078
hsa-miR-221-5p	-2,39	0,0012	-5,33	0,0000
hsa-let-7e-3p	-2,39	0,0000	-1,33	0,0008
hsa-miR-222-3p	-2,06	0,0000	-7,04	0,0000
hsa-miR-378a-5p	-1,90	0,0003	-2,60	0,0000
hsa-miR-598	-1,88	0,0000	-2,07	0,0000
hsa-miR-148a-5p	-1,88	0,0000	-1,78	0,0000
hsa-miR-200c-5p	-1,84	0,0007	-1,39	0,0212
hsa-miR-192-5p	-1,77	0,0000	-1,32	0,0000
hsa-miR-193b-5p	-1,77	0,0173	-1,80	0,0046
hsa-miR-125a-3p	-1,76	0,0000	-1,25	0,0003
hsa-miR-26a-2-3p	-1,74	0,0000	-1,41	0,0003
hsa-miR-28-3p	-1,74	0,0000	-2,04	0,0000
hsa-miR-26b-3p	-1,73	0,0110	-1,52	0,0186
hsa-miR-218-5p	-1,69	0,0000	-2,76	0,0000
hsa-miR-221-3p	-1,69	0,0000	-7,29	0,0000
hsa-miR-99b-3p	-1,66	0,0000	-1,24	0,0000
hsa-miR-140-3p	-1,62	0,0000	-1,33	0,0000
hsa-miR-200c-3p	-1,59	0,0000	-1,33	0,0000
hsa-miR-148a-3p	-1,58	0,0000	-1,88	0,0000
hsa-miR-148b-5p	-1,54	0,0173	-1,37	0,0412
hsa-miR-27a-5p	-1,53	0,0000	-1,25	0,0001
hsa-miR-378c	-1,52	0,0107	-2,20	0,0000
hsa-miR-27a-3p	-1,45	0,0000	-1,25	0,0000
hsa-miR-374b-3p	-1,44	0,0027	-1,25	0,0275
hsa-miR-296-3p	-1,43	0,0000	-1,41	0,0000
hsa-miR-23a-3p	-1,43	0,0000	-1,27	0,0000
hsa-miR-28-5p	-1,42	0,0000	-1,76	0,0000
hsa-miR-374a-3p	-1,41	0,0000	-1,40	0,0000
hsa-miR-149-5p	-1,39	0,0000	-1,46	0,0000
hsa-miR-374b-5p	-1,39	0,0000	-1,23	0,0001
hsa-miR-193b-3p	-1,34	0,0000	-2,14	0,0000
hsa-let-7b-5p	-1,34	0,0000	-1,25	0,0000
hsa-let-7i-5p	-1,34	0,0000	-1,25	0,0000
hsa-miR-877-5p	-1,34	0,0022	-1,30	0,0023
hsa-miR-378a-3p	-1,34	0,0000	-2,22	0,0000
hsa-miR-424-5p	-1,30	0,0000	-5,21	0,0000
hsa-miR-769-5p	-1,29	0,0000	-1,65	0,0000

hsa-miR-629-5p	1,20	0,0257	1,73	0,0000
hsa-miR-193a-5p	1,32	0,0000	1,38	0,0000
hsa-miR-423-3p	1,33	0,0000	1,35	0,0000
hsa-miR-561-5p	1,36	0,0002	1,99	0,0000
hsa-miR-425-5p	1,37	0,0000	1,31	0,0000
hsa-miR-197-3p	1,37	0,0000	1,28	0,0000
hsa-miR-574-5p	1,39	0,0015	1,49	0,0000
hsa-miR-339-5p	1,39	0,0000	1,21	0,0000
hsa-miR-7-5p	1,50	0,0000	1,81	0,0000
hsa-miR-92b-3p	1,54	0,0000	2,09	0,0000
hsa-miR-500a-5p	1,55	0,0170	1,41	0,0490
hsa-miR-96-5p	1,56	0,0000	1,50	0,0000
hsa-miR-345-5p	1,59	0,0000	1,66	0,0000
hsa-miR-146b-5p	1,61	0,0000	1,66	0,0000
hsa-miR-590-3p	1,63	0,0000	1,33	0,0060
hsa-miR-92b-5p	1,70	0,0090	2,19	0,0000
hsa-miR-1285-3p	1,74	0,0000	1,30	0,0020
hsa-miR-196a-5p	1,75	0,0008	3,11	0,0000
hsa-miR-339-3p	1,78	0,0000	1,44	0,0000
hsa-miR-196b-5p	2,02	0,0002	4,15	0,0000
hsa-miR-1246	2,06	0,0000	1,41	0,0090
hsa-miR-29b-3p	2,16	0,0000	1,31	0,0000
hsa-miR-24-1-5p	2,23	0,0004	1,59	0,0462
hsa-miR-29a-3p	2,60	0,0000	1,58	0,0000
hsa-miR-1296	2,82	0,0000	2,54	0,0000
hsa-miR-30c-2-3p	3,44	0,0000	4,13	0,0000
hsa-miR-30a-3p	3,91	0,0000	4,50	0,0000
hsa-miR-30a-5p	4,36	0,0000	4,54	0,0000
hsa-let-7c	4,41	0,0000	2,50	0,0000
hsa-miR-3909	4,44	0,0193	3,83	0,0429
hsa-miR-99a-5p	4,65	0,0000	2,71	0,0000
hsa-miR-1269a	5,06	0,0000	13,36	0,0000
hsa-miR-125b-5p	5,89	0,0000	4,09	0,0000
hsa-miR-125b-2-3p	6,46	0,0000	3,72	0,0000
hsa-miR-99a-3p	7,24	0,0001	4,67	0,0075
hsa-miR-338-3p	16,50	0,0000	2,99	0,0004

Tabella 4. Lista dei miRNA comunemente regolati nei cloni Ct-RE β e Nt-RE β rispetto al controllo MCF-7 wt.

In seguito a lisi frazionata citosol-nucleo, le proteine citosoliche isolate sono state incubate con gli anticorpi anti-myc o anti-AGO2 per l'immunoprecipitazione delle proteine esca di interesse.

Gli immunocomplessi isolati sono stati quindi analizzati mediante *SDS-PAGE* e *western blot*. Come si può osservare in fig.26, immunoprecipitando RE β si rileva la presenza di una banda corrispondente ad AGO2 endogeno solo dopo stimolazione con doxiciclina, e quindi solo in presenza del recettore.

Al contrario, nei campioni immunoprecipitati per AGO2 si evidenzia una banda corrispondente a RE β soltanto in seguito ad induzione con l'antibiotico. Campioni *input* sono stati usati come controllo dell'effettiva presenza delle due proteine prima dell'immunoprecipitazione.

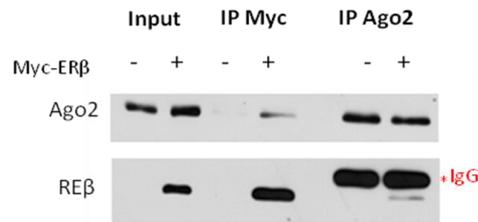


Figura 26. Co-immunoprecipitazione RE β -AGO2 nei cloni inducibili MycFlag. L'analisi di Western Blot condotta con gli anticorpi primari anti-myc (Millipore) e anti-AGO2 (Abcam) mostra che negli immunoprecipitati (IP) per RE β non vi sono bande corrispondenti ai pesi molecolari del recettore e di AGO2 in assenza di doxyciclina (-) mentre le rispettive bande sono osservabili negli IP in presenza di doxyciclina (+). Analogamente, negli IP per AGO2 si osserva la presenza della banda in corrispondenza del peso molecolare di AGO2 ma non di RE β in assenza di doxyciclina, che invece si osserva dopo stimolazione con l'antibiotico.

Successivamente, al fine di validare l'interazione del recettore con AGO2 anche *in vivo* sono stati effettuati esperimenti di PLA seguendo la procedura descritta in Materiali e Metodi. In particolare, l'associazione è stata osservata in seguito a co-transfezione transiente di plasmidi esprimenti *myc-AGO2* e *flag-RE β* in cellule MCF-7 wt.

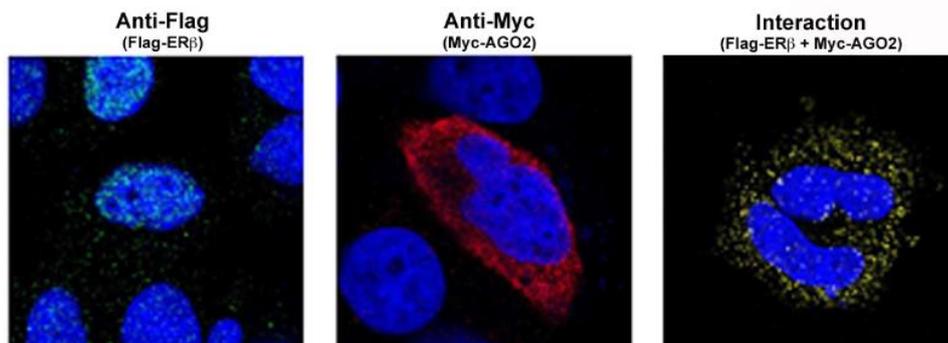


Figura 27. Validazione dell'interazione RE β /AGO2 *in vivo* valutata mediante Proximity Ligation Assay (PLA). Il pannello di sinistra e quello centrale mostrano l'espressione di RE β e AGO2 rispettivamente mentre il riquadro di destra mostra la co-espressione delle due proteine. I nuclei sono stati colorati con il DAPI.

Come mostrato nel pannello a destra della fig. 27, RE β ed AGO2 sembrano essere associate per formare complessi multiproteici sia nel nucleo che nel citoplasma di cellule di CM in assenza di stimolo ormonale; tale metodica, infatti, consente la rilevazione immunocitochimica di segnali di fluorescenza solo quando le due proteine di interesse interagiscono tra loro.

Una volta validata l'interazione di RE β con AGO2, al fine di stabilirne il ruolo funzionale nel contesto dei meccanismi di silenziamento genico mediati da miRNA, sono stati effettuati esperimenti di immunoprecipitazione del RNA seguiti da sequenziamento massivo parallelo (RIP-seq), dettagliatamente descritti in Materiali e Metodi. Tali esperimenti sono stati condotti sui cloni inducibili *MycFlag*-RE β , immunoprecipitando il recettore e AGO2 endogeno mediante l'utilizzo degli anticorpi anti-myc e anti-AGO2 ed isolando poi l'RNA ad essi legato e con essi immunoprecipitato. Dall'RNA estratto sono state generate librerie di sequenziamento di RNA totale e *small*-RNA, in accordo con il protocollo Illumina (Materiali e Metodi). Le librerie sono state sequenziate su piattaforma HiSeq2500. Inoltre, come controllo sono state usate cellule non indotte con doxiciclina (RE β negative) e l'immunoprecipitazione è stata effettuata incubando gli estratti proteici anche con immunoglobuline G (IgG), al fine di eliminare qualsiasi artefatto dovuto alla metodica e per essere confidenti della validità dei risultati ottenuti.

Le *reads* ottenute dal sequenziamento del RNA sono state allineate al genoma umano di riferimento e i livelli di espressione di ciascun mRNA sono stati normalizzati come riportato in Materiali e Metodi. Al fine di identificare gli mRNA arricchiti perché specificamente legati dal complesso RE β /AGO2, sono stati effettuati gli opportuni confronti tra i differenti campioni fissando il *False Discovery Rate* (FDR) ≤ 0.05 e il *fold-enrichment* (FE) ad un valore soglia ≥ 1.5 . In primo luogo sono stati individuati i trascritti arricchiti dopo immunoprecipitazione rispetto al campione di partenza *input* sia in cellule RE β positive che negative (tab.5).

Sample	Control	Transcripts *FE \geq 1.5 ** FDR \leq 0.05
MCF7 (+DOXY) IP AGO2	MCF7 (+DOXY) INPUT	3257
MCF7 (-DOXY) IP AGO2	MCF7 (-DOXY) INPUT	3552
MCF7 (+DOXY) IP RE β	MCF7 (+DOXY) INPUT	401
MCF7 (-DOXY) IP RE β	MCF7 (-DOXY) INPUT	99
MCF7 (+DOXY) IP IgG	MCF7 (+DOXY) INPUT	1471

Tabella 5. Numero di trascritti arricchiti dopo immunoprecipitazione (IP) rispetto all'input. I trascritti arricchiti in seguito ad immunoprecipitazione di AGO2 (IP AGO2), di RE β (IP RE β) o di IgG di controllo sono stati identificati rispetto al campione di partenza (input). *FE= Fold-Enrichment; **FDR=False Discovery Rate.

Mediante la serie di confronti riportati schematicamente come diagrammi di Venn in fig.28, sono stati identificati 806 mRNA immunoprecipitati da AGO2 esclusivamente in presenza di RE β . Successivamente, affinché potessero essere selezionati i trascritti legati specificamente dal recettore, gli mRNA arricchiti immunoprecipitando RE β in

cellule stimolate con doxiciclina sono stati confrontati con quelli ottenuti immunoprecipitando con le IgG di controllo; tale incrocio ha permesso di sottrarre gli effetti di un legame aspecifico e di individuare 186 trascritti legati dal recettore costitutivamente in cellule di CM MCF-7.

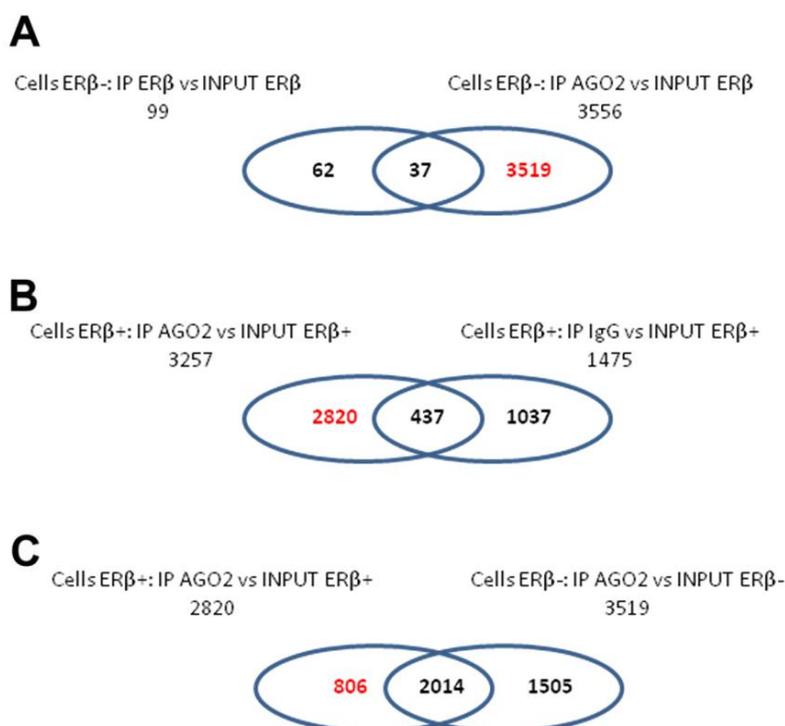


Figura 28. Analisi di confronti effettuati per individuare i mRNA legati da AGO2 in presenza di RE β . In seguito al confronto riportato in **A** sono stati identificati i trascritti legati da AGO2 in cellule RE β -negative mentre dopo il confronto in **B** quelli legati da AGO2 in cellule esprimenti il recettore. In **C** sono confrontati i due *dataset* ottenuti per individuare i mRNA selettivamente arricchiti immunoprecipitando AGO2 nelle cellule RE β positive.

In ultima analisi, comparando i trascritti legati da AGO2 in presenza di RE β (806) con quelli legati dal recettore (186), sono 28 i mRNA risultati in comune tra i due *dataset* considerati e quindi immunoprecipitati in maniera specifica dal complesso RE β /AGO2 (tab.6). I dati ottenuti dal sequenziamento delle librerie di *small*-RNA sono stati analizzati usando la *pipeline* iMir, come riportato in Materiali e Metodi. Come per i trascritti, anche in questo caso il primo passo è stato individuare i trascritti arricchiti dopo immunoprecipitazione rispetto al campione di partenza *input* sia in cellule RE β positive che negative. Allo scopo di identificare i miRNA associati al complesso RE β /AGO2, sono stati eseguiti gli stessi confronti effettuati in precedenza per i trascritti, fissando i medesimi valori soglia di FDR e FE (≤ 0.05 e ≥ 1.5 rispettivamente). I risultati così ottenuti hanno identificato 9 miRNA univocamente immunoprecipitati dal recettore in associazione con AGO2 (tab.7), su cui si sono

focalizzate le analisi successive. Analisi *in silico* di predizione dei *target* putativi di tali miRNA condotte mediante l'utilizzo del *tool* miRWalk 2.0., hanno mostrato che tra di essi rientrano la maggior parte dei 28 trascritti legati da RE β e AGO2. Infine, analisi funzionali effettuate utilizzando il *software* IPA sui trascritti identificati come potenziali bersagli molecolari del complesso RE β /AGO2/miRNA, hanno evidenziato che essi sono coinvolti in diversi *pathway* cellulari compresi crescita e proliferazione cellulare, ciclo cellulare, meccanismi di replicazione, ricombinazione e riparazione del DNA, oltre che nello sviluppo dei tessuti e del sistema riproduttivo (fig 29).

Gene	IPRE β _vs_Input_FE	padj	IPAGO2_vs_Input_FE	padj
COQ9	1.52	5.12E-05	2.83	1.72E-38
GBP2	1.52	0.036917	1.52	0.018171
RNF8	1.53	0.000373	2.19	5.63E-15
PDRG1	1.55	1.38E-08	1.51	1.24E-07
ZNF846	1.55	0.042893	1.63	0.010321
EIF4A3	1.56	4.37E-20	1.85	7.45E-37
EIF4ENIF1	1.58	0.000026	2.13	7.06E-16
ZNF642	1.59	0.015173	2.09	4.33E-06
TOE1	1.6	0.011099	2.12	1.1E-06
SLC4A1AP	1.61	7.13E-08	2.36	2.33E-30
DDX10	1.61	0.0014	1.78	3.45E-05
ZNF57	1.67	0.002485	1.62	0.003254
RP13-516M14.1.1	1.67	0.041657	1.81	0.007581
HUNK	1.69	0.034435	1.59	0.045716
RPS3AP6	1.72	0.027933	2.45	8.35E-06
HNRNPA1	1.73	3.3E-145	1.99	4.3E-224
RP5-1103G7.4.1	1.75	0.000167	1.54	0.003708
SP110	1.78	0.000155	2.66	1.32E-15
C2orf44	1.79	1.29E-07	2.1	1.6E-12
EXO1	1.81	0.0002	1.55	0.006081
KB-1460A1.1.1	1.88	0.048004	1.88	0.024432
ANO2	2.02	0.024962	2.75	7.94E-05
RP11-669N7.2.1	2.13	0.000042	1.56	0.029392
RP11-491I1.1.1	2.14	0.022898	3.65	1.69E-07
HABP4	2.25	0.001335	2.6	4.38E-05
RPS17	2.38	0.028664	2.26	0.029547
RP11-490M8.1.1	2.54	0.031232	2.32	0.040071
PRTFDC1	2.71	0.023475	2.58	0.024708

Tabella 6. Lista dei 28 mRNA legati dal complesso RE β /AGO2.

Capitolo IV *Studio dei meccanismi di regolazione mediati dal recettore degli estrogeni β costitutivo in cellule di carcinoma mammario*

miRNA	IPAGO2_vs_input FE	pvalue	padj	IPRE β _vs_input FE	pvalue	padj
hsa-miR-92b-3p	1.51	2.7E-173	5.7E-172	1.67	6.1E-17	7.44E-16
hsa-let-7c-5p	1.55	2.27E-47	1.96E-46	2.22	4.01E-17	5.14E-16
hsa-miR-1307-3p	1.75	0.004541	0.009429	2.22	0.021547	0.065668
hsa-miR-320a	4.18	6.2E-115	9.7E-114	2.4	5.09E-05	0.000261
hsa-miR-181a-3p	2.67	1.21E-86	1.59E-85	2.59	4.04E-11	3.33E-10
hsa-miR-125a-3p	2.98	3.18E-10	1.31E-09	3.77	0.004933	0.017785
hsa-miR-193b-5p	2.98	0.000806	0.001896	5.08	0.024189	0.072003
hsa-miR-342-5p	2.08	0.019943	0.035137	6.18	0.004318	0.015791
hsa-miR-25-5p	4.71	4.88E-29	3.37E-28	6.6	5.87E-08	3.75E-07

Tabella 7. Lista dei miRNA specificamente immunoprecipitati dal complesso RE β /AGO2.

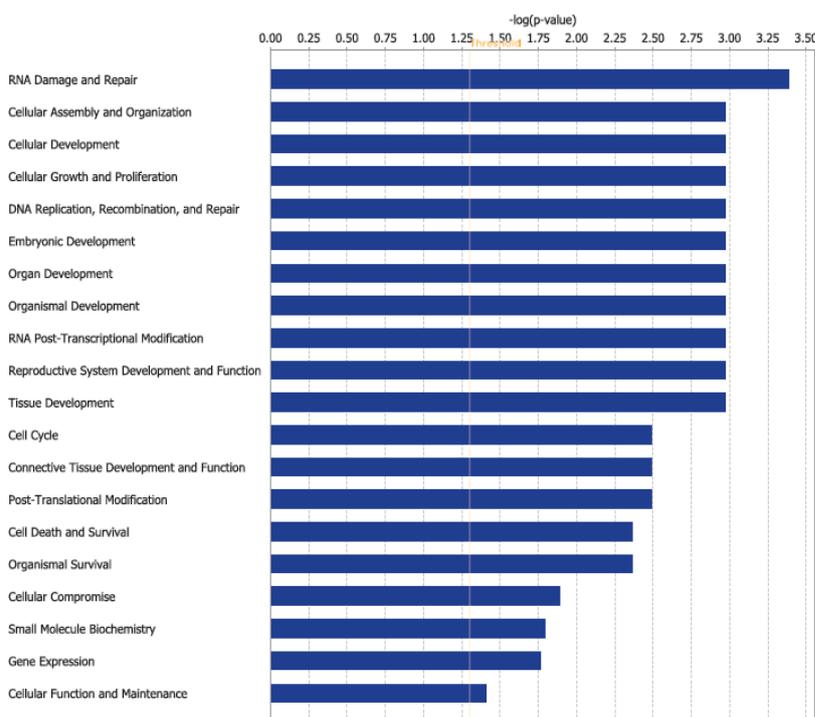


Figura 29. Analisi funzionale degli mRNA immunoprecipitati dal complesso RE β /AGO2/miRNA. Analisi funzionale eseguita con IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*) dei 28 trascritti legati specificamente da RE β in associazione con AGO2 ($FE \geq 1.5$; $p\text{-value} \leq 0.05$). La barra arancione indica il valore soglia di $p\text{-value}$.

5.1 Conclusioni

I miRNA e gli altri sncRNA sono coinvolti nella patogenesi di molte malattie in quanto regolano l'espressione di geni che possono essere fondamentali per lo *status* fisiologico dell'organismo. Variazioni dei loro livelli di espressione sono state osservate in un'elevato numero di patologie umane, inclusi i disordini cardiovascolari e cancro, per le quali tali ncRNA rappresentano potenziali biomarcatori e bersagli su cui sviluppare nuove strategie terapeutiche.

Ulteriori studi sono tuttavia necessari affinché vengano chiariti i meccanismi con cui i miRNA e gli altri sncRNA regolano l'espressione genica e la maggior parte dei processi cellulari. Partendo da tali evidenze, il progetto di ricerca è stato finalizzato ad ottenere una maggiore comprensione di questi meccanismi molecolari in tre diversi modelli sperimentali quali piastrine attivate *in vitro*, tessuti di adenocarcinoma endometriale di tipo I e linee cellulari di CM esprimenti RE β in assenza di stimolo estrogenico.

L'attivazione piastrinica indotta *in vitro* con diversi agonisti fisiologici determina una riorganizzazione del proteoma piastrinico mediante la regolazione dei livelli di espressione di proteine coinvolte nella risposta infiammatoria, nell'immunità, nella cascata coagulativa e nelle funzioni ematologiche. Tale riprogrammazione riflette cambiamenti del profilo di espressione dei miRNA successivi all'attivazione e che non dipendono dalla natura dello stimolo attivante, suggerendo l'esistenza di meccanismi molecolari della risposta piastrinica comuni a diversi eventi di segnalazione. I risultati ottenuti, inoltre, dimostrano che le piastrine non solo sono coinvolte nella formazione del tappo emostatico ma svolgono un ruolo attivo anche nella complessa rete di collegamento tra la coagulazione e l'immunità (Bruno *et al.*, 2014). La regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica mediata dai miRNA rappresenta, dunque, uno dei meccanismi con cui le piastrine modificano la propria funzionalità e reattività in risposta agli stimoli attivatori; pertanto, questi piccoli RNA non codificanti risultano essere nuovi potenziali bersagli delle terapie antitrombotiche per la cura di disordini cardiovascolari caratterizzati da un'eccessiva attivazione ed aggregazione piastrinica, comprese le sindromi coronariche acute.

Mediante esperimenti di sequenziamento dei sncRNA eseguiti su tessuti di endometrio sano, iperplastico e tumorale, è stata caratterizzata una "*signature*" di 142 sncRNA coinvolti nel processo tumorigenico. Appartenenti a questo gruppo sono stati identificati 127 miRNA (di cui 2 non annotati in banche dati ed individuati come potenziali nuovi miRNA), 10 piRNA e 3 snoRNA. Questi risultati confermano che i piRNA non sono espressi solo nella linea germinale ma anche nelle cellule somatiche e dimostrano che essi, come pure gli snoRNA, sono direttamente implicati nello sviluppo e nella progressione del tumore endometriale.

Analisi funzionali hanno, inoltre, rivelato che la "*signature*" influenza numerosi *pathway* cellulari, incluse le vie di segnalazione intracellulari di TGF- β , ERK/MAPK e Wnt- β catenina, sulle quali tali sncRNA sembrano agire in sinergia tra di loro nel regolare gli stessi bersagli molecolari.

I risultati ottenuti sono stati recentemente pubblicati sulla rivista *Oncotarget* (Ravo *et al.*, 2015).

In cellule di CM ormono-responsive MCF-7 la presenza di RE β correla con una migliore prognosi e un fenotipo meno aggressivo della malattia. Nuovi studi hanno

messo in evidenza l'esistenza di un'attività costitutiva del recettore, il quale nella sua forma "unliganded" risulta equidistribuito tra citosol e nucleo. Mediante esperimenti di RNA-Seq e ChIP-Seq sono stati individuati 135 geni *target* del recettore, la cui analisi funzionale ne ha rivelato il coinvolgimento nella crescita e nella proliferazione cellulare, nel movimento cellulare, nella segnalazione cellula-cellula, dei disordini del sistema endocrino oltre che nel cancro, come riportato nel manoscritto in preparazione Tarallo R, Giurato G, Bruno G et al., 2016.

Esperimenti di miRNA-Seq hanno mostrato che RE β costitutivo regola il profilo di espressione di miRNA coinvolti nello sviluppo e/o nella progressione del CM, nella EMT, oltre che nell'apoptosi. RE β sembra agire da oncosoppressore andando ad aumentare, inoltre, i livelli di espressione di miRNA notoriamente espressi con bassi livelli in molte forme di cancro quali let-7d e miR-125a.

Da esperimenti di proteomica quantitativa condotti in parallelo nell'ambito di altre attività di ricerca del Laboratorio di Medicina Molecolare e Genomica dove ho svolto il Dottorato è emerso come interattore molecolare di RE β in cellule di CM MCF-7 la proteina AGO2. Siccome AGO2 rappresenta uno dei principali protagonisti del silenziamento genico mediato dai miRNA, di interesse è stato stabilire il ruolo funzionale di tale interazione. Dopo aver validato l'associazione di AGO2 con il recettore grazie a co-immunoprecipitazione e saggio *in vivo* PLA, mediante RIP-Seq sono stati identificati 28 mRNA e 9 miRNA legati specificamente dal complesso RE β /AGO2 (Giurato G, Tarallo R, Bruno G et al., 2015).

Tali risultati suggeriscono un nuovo possibile ruolo di RE β costitutivo in associazione con la proteina AGO2 nella regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica mediata dai miRNA.

6.1 Prelievo, purificazione ed attivazione piastrinica

Per isolare le piastrine, sangue intero è stato prelevato da 15 volontari sani, uomini, che si sono astenuti dall'assunzione di qualsiasi farmaco nelle ore precedenti al prelievo. Sono stati reclutati solo uomini per escludere qualsiasi effetto dipendente dalla presenza di ormoni femminili. Tutti i volontari hanno autorizzato un consenso informato, approvato dal comitato etico locale della Seconda Università degli Studi di Napoli. Da ciascuno sono stati prelevati 50 ml di sangue, che sono stati trasferiti in tubi contenenti una soluzione di sodio citrato 0,105 M (1:10 V/V) per poi procedere alla purificazione delle piastrine entro i primi 15 minuti dal prelievo. Durante tale processo il sangue è stato centrifugato a 160 g per 15 minuti a temperatura ambiente e il plasma ricco di piastrine (PRP) così ottenuto è stato filtrato usando uno specifico sistema di rimozione dei leucociti (*Pure Cell PALL*, Pall Italia, Buccinasco). La contaminazione leucocitaria è stata valutata mediante citometria a flusso e analisi di *real time* PCR (rtPCR) per valutare l'espressione di antigeni di superficie specifici per piastrine (CD-41) e per leucociti (CD-45), ed utilizzando GADPH come gene *housekeeping* di controllo.

Gli oligonucleotidi usati per l'amplificazione mediante PCR sono stati:

CD41: fwd 5'-AAGGTGAGAGGGAGCAGAAC-3',
rev 5'-CTGCAGCACAAACTGATCC-3';
CD45: fwd 5'-TCAGATGTCCCAGGAGAGAG-3',
rev 5'-CACCTCATTGTTTGTGCAAG-3';
GAPDH: fwd 5'-AACGGATTTGGTCTATTGGGC-3',
rev 5'-TCGCTCCTGGAAGATGGTGATG-3'.

Le piastrine purificate da ogni donatore sono state divise in 4 aliquote differenti: una prima aliquota è stata processata immediatamente dopo la preparazione ed utilizzata come controllo basale (T0); tre aliquote sono state trattate con ADP (20µM) (Sener *et al.*, 2013), collagene (COLL, 60µM/mL) (Cirillo *et al.*, 1999) o TRAP (25µM) (Mangalpally *et al.*, 2010) e sottoposte ad attivazione in vitro per 120 minuti a 37°C in agitazione.

L'aggregazione piastrinica è stata verificata in tutti i campioni mediante la formazione di macro-aggregati e confermata mediante specifici test di aggregometria. Dopo 2 ore dalla stimolazione, le piastrine sono state centrifugate a 2000g a 4°C, poi sono state lavate 3 volte con PBS e infine conservate a -80°C per le analisi successive.

6.2 Selezione e prelievo dei tessuti endometriali

Per condurre lo studio sono state selezionate 10 pazienti con un'età media di 58 anni affette da carcinoma dell'endometrio e le cui caratteristiche cliniche sono riportate in tab.1 del paragrafo Risultati e Discussione relativo a questo studio. In collaborazione con i Dipartimenti di Ostetricia e Ginecologia dell'Università di Salerno e dell'Università di Napoli Federico II, mediante isteroscopia, da tali pazienti sono state prelevate biopsie di tessuto tumorale, di tessuto normale adiacente e di tessuto iperplastico quando possibile.

Sono state reclutate, inoltre, donatrici sane non affette da cancro dell'endometrio ma sottoposte ad isteroscopia per anormale sanguinamento uterino. I tessuti prelevati

sono stati mantenuti in ghiaccio secco durante tutto il tempo di campionamento e di manipolazione. L'istologia di ogni tumore è stata classificata in accordo con i criteri del *World Health Organization*. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliera Ospedali Riuniti S. Giovanni di Dio e Ruggi d'Aragona di Salerno e il consenso informato è stato ottenuto dalle pazienti e dalla volontarie reclutate.

6.3 Linee cellulari e condizioni di coltura

Per i diversi esperimenti sono state utilizzate le seguenti linee cellulari di CM: MCF-7 *wild type* (MCF-7 *wt*) (ATCC, Cat. nr. HTB-22) RE α -positive e i cloni stabili esprimenti RE β fuso ad una *tag* (TAP-*tag*) all'estremità C-terminale (Ct-RE β) o N-terminale (Nt-RE β), precedentemente generati e caratterizzati nel Laboratorio di Medicina Molecolare e Genomica, dove ho svolto il Dottorato di Ricerca. Inoltre, per lo studio dell'interazione RE β /AGO2 sono stati utilizzati cloni cellulari di cellule MCF-7 in cui l'espressione di RE β , fuso alla *tag Myc-Flag* all'estremità C-terminale, è inducibile dall'antibiotico tetraciclina o da suoi analoghi, quali la doxiciclina (sistema *Tet-On*), ugualmente già disponibili presso lo stesso laboratorio.

Le linee cellulari sono state mantenute in mezzo di coltura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), contenente rosso fenolo (*Sigma-Aldrich*), complementato con L-Glutammina (2mM), Siero Fetale Bovino (FBS) al 10% (*Hyclone*), Penicillina (100U/ml), Streptomina (100 μ g/ml), Amfotericina B (250mg/ml) e Geneticina (100 μ g/ml) (condizioni di crescita *standard*). Le cellule sono state periodicamente testate per valutare l'eventuale presenza di micoplasma utilizzando il *kit MycoAlert mycoplasma detection* (*Lonza*), a cui sono risultate negative. Le cellule sono state tenute in incubazione a 37°C ad una concentrazione fissa di CO₂ pari al 5% ed il mezzo di coltura è stato cambiato ogni due giorni.

Per gli esperimenti effettuati in assenza di stimoli estrogenici, le cellule sono state sincronizzate in fase G0-G1 mantenendole per cinque giorni in mezzo di coltura DMEM (*Sigma-Aldrich*) privo di rosso fenolo (che ha azione estrogeno-simile), complementato con 5% FBS trattato con DCC (DCC: *Dextran-Coated Charcoal*; il siero è stato pre-trattato con carbone attivo ricoperto da molecole di destrano, allo scopo di rimuovere gli steroidi in esso contenuti), L-Glutammina (2mM), Penicillina (100U/ml), Amfotericina B (250mg/ml), Geneticina (100 μ g/ml).

6.4 Estrazione di RNA, RNA-Seq, *small*RNA-Seq e analisi dati

Le piastrine purificate da ciascuno dei 15 volontari sono state combinate in 5 gruppi di 3 campioni ognuno, dai quali è stato estratto l'RNA totale con il *kit mirVana PARIS* (*Life Technologies*). Per il sequenziamento dell'RNA (RNA-Seq), i campioni sono stati combinati in 3 gruppi e le librerie indicizzate sono state preparate a partire da 500ng di RNA totale per ogni gruppo di campioni mentre per il sequenziamento dei piccoli RNA non-codificanti (*small*RNA-Seq), tutti i campioni di RNA ottenuti dai 15 volontari sono stati combinati in un unico gruppo per ogni trattamento.

I tessuti di endometrio prelevati sono stati omogeneizzati usando il *TissueLyser LT* (*Qiagen*) e l'RNA totale è stato estratto usando *miRVana RNA isolating kit* (*Ambion*) in accordo con il protocollo standard.

L'estrazione dell'RNA dalle linee cellulari di CM MCF-7 e dai cloni esprimenti RE β sia stabilmente che in maniera inducibile è stata effettuata seguendo il metodo classico di estrazione con TRIzol (*Life Technologies*).

La concentrazione di RNA è stata determinata con lo spettrofotometro ND-100 (*Nano Drop, ThermoScientific*) e la qualità è stata valutata con il *Bioanalyzer Agilent 2100*, usando i *kit Agilent RNA nano 6000 (Agilent Technologies)*.

Per la preparazione di librerie di RNA-Seq è stato usato il *TruSeq Stranded Total RNA sample prep kit* (Illumina Inc.), seguendo il protocollo standard. Le librerie sono state sequenziate su piattaforma HiSeq1500 (Illumina Inc.) ad una concentrazione di 8 pM per lane.

Le sequenze ottenute sono state sottoposte agli opportuni controlli di qualità (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) e poi allineate al genoma umano di riferimento (*hg19 assembly*) usando *TopHat* versione 2.0.10 con i parametri standard. I valori di espressione di ogni mRNA identificato sono stati normalizzati rispetto al valore FPKM (*fragments per kilobase of exon model per million of sequenced reads*) (Trapnell *et al.*, 2012). Ciascun mRNA è stato considerato espresso in maniera significativa se presente con un numero di read (*Read Count, RC*) ≥ 10 . L'analisi differenziale dei trascritti espressi è stata effettuata usando *Bioconductor DESeq* versione 1.14.0, un pacchetto integrato in iMir (Giurato *et al.*, 2013). L'espressione differenziale è stata riportata in termini di FC fissato ai valori soglia di ≤ -1.5 e ≥ 1.5 e di *adjusted p-value* (FDR ≤ 0.05) applicando il fattore di correzione di Benjamini-Hochberg.

Le librerie indicizzate di smallRNA sono state preparate a partire da 1 μ g di RNA totale, usando il *TruSeqSmall RNA Sample Prep kit* (Illumina Inc.) in accordo con il protocollo standard. Le librerie sono state purificate mediante escissione da gel e sequenziate su HiSeq2500 (Illumina Inc.) a una concentrazione di 10pM.

I dati di sequenza ottenuti sono stati analizzati usando la *pipeline* iMir (Giurato *et al.*, 2013), applicando il flusso di lavoro standard, che include anche analisi di espressione differenziale e predizione di *target*. Le reads ottenute dai replicati tecnici sono state sommate e normalizzate per RPM (*reads per million*). Sono stati considerati espressi significativamente i miRNA rilevati con un valore di RMP ≥ 10 .

Per l'analisi di espressione differenziale è stato utilizzato DESeq, solo i miRNA aventi un FC entro i valori soglia stabiliti e un *p-value* ≤ 0.05 sono stati considerati differenzialmente espressi. La predizione dei nuovi potenziali miRNA è stata effettuata con *Module 3* del *tool* iMir (*miRanalyzer* e *miRDeep2*) (Giurato *et al.*, 2013). I *target* putativi dei piRNA sono stati identificati mediante complementarità di sequenza tra ciascun piRNA (piRNABank, Institute of Bioinformatics and Applied Biotechnology, Bangalore, India) e le regioni 5'-UTR, CDS o 3'-UTR di tutti gli RNA umani annotati (RefSeq gene annotations) usando miRanda v3.3 (John *et al.*, 2004).

6.5 Microarray e analisi dati

Per l'analisi dei profili di espressione genica 5 campioni di RNA estratto da biopsie provenienti dalle stesse pazienti sono stati combinati per formare un unico gruppo per ciascun tipo di tessuto: normale (1N, 3N, 4N, 5N, 7N), iperplastico (1H, 3H, 4H, 5, 7H) e tumorale (1T, 3T, 4T, 5T, 7T).

A partire da 500 ng di RNA totale per ogni gruppo sono stati sintetizzati il cDNA e il cRNA biotinilato, in accordo con il protocollo Illumina *TotalPrep RNA Amplification kit* (Ambion). Per ciascun gruppo, 750 ng di cRNA sono stati ibridizzati per 18 ore a 55°C su *Illumina HumanHT-12 v4.0 BeadChips* (Illumina Inc.)

L'analisi dei dati ottenuti dal iSCAN Illumina è stata effettuata con il *software GenomeStudio* versione 2011.1. I dati sono stati normalizzati con l'algoritmo *Quantile* e sono stati considerati espressi solo i geni con un *Detection p-value* ≤ 0.01 . La significatività statistica è stata calcolata con l'algoritmo Illumina *DiffScore*: solo i geni con *DiffScore* ≤ -30 e ≥ 30 (corrispondente ad un valore di *p-value* pari a 0.001) sono stati considerati espressi in maniera significativa.

6.6 Immunoprecipitazione della cromatina, sequenziamento e analisi dati

Gli esperimenti di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) sono stati effettuati sui cloni Ct-RE β e sulle cellule MCF-7 wt di controllo mantenute in condizioni di deprivazione ormonale per 5 giorni. Successivamente le cellule (5×10^6 /punto sperimentale) sono state fissate, lisate e sonicate come descritto da Ambrosino et al. (Ambrosino et al., 2010). Un'aliquota di estratto cellulare è stata prelevata come *input*. Per immunoprecipitare RE β i campioni di cromatina sono stati incubati per 3 ore a 4°C con 30 μ l di *IgG Sepharose 6 fast Flow* (GE Healthcare Bio-Science AB) opportunamente equilibrata in colonne cromatografiche Poly-Prep (0.84 cm, Bio-Rad) seguendo il relativo protocollo.

I lavaggi post-binding, l'eluizione, il reverse cross-linking e l'estrazione del DNA sono stati eseguiti come precedentemente riportato (Ambrosino et al.).

La lunghezza dei frammenti di DNA immunoprecipitato è stata valutata mediante corsa al *Bioanalyzer Agilent 2100* usando il *kit High Sensitivity DNA (Agilent Technologies)*, mentre la concentrazione è stata determinata con il *Qubit Fluorometer* usando il *Quant-IT DNA Assay kit-High Sensitive DNA (Life Technologies)*. Librerie indicizzate sono state ottenute a partire da 10 ng di DNA usando il *TruSeq ChIP sample prep kit* (Illumina Inc.). Le librerie sono state sequenziate su piattaforma HiSeq 2500 alla concentrazione di 8 pM.

Le sequenze ottenute sono state sottoposte agli opportuni controlli di qualità usando *FastQC* (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) e poi allineate al genoma umano di riferimento (*hg19 assembly*) usando il *software Bowtie* (Langmead et al., 2009). I picchi arricchiti corrispondenti ai siti di legame di RE β al DNA sono stati identificati mediante l'utilizzo del *software HOMER (Hypergeometric Optimization of Motif EnRichment)* settando i parametri standard e un FDR pari al 10%.

La ricerca dei motivi più rappresentati è stata effettuata con l'applicazione *MatInspector* (Cartharius et al., 2005) di *Genomatix Software Suite*.

Le matrici ER0.01, ER.02, ER.03 e ER.04 (*Genomatix Matrix Library 8.2*) sono state cercate tra le sequenze delle regioni di legame di RE β al genoma fissando i seguenti parametri: *core similarity threshold* pari a 0.75 e *matrix similarity threshold of Optimal* pari a -0.02. Le sequenze che presentavano almeno una delle tre matrici dei RE sono state indicate come ERE+.

6.7 Estrazioni proteiche, co-immunoprecipitazione e western blot

Le proteine sono state estratte da piastrine attivate con il *kit* mirVana PARIS (*Life Technologies*), che permette di estrarre in parallelo RNA e proteine dallo stesso campione, seguendo il protocollo standard. La concentrazione proteica è stata determinata per ogni campione con il *kit* EZQ Protein Quantitation (*Life Technologies*) e le analisi delle proteine così isolate sono state condotte mediante Western Blot.

Al fine di validare l'interazione di RE β con AGO2, è stata effettuata l'estrazione frazionata delle proteine citosoliche in cloni esprimenti RE β in seguito ad induzione per 24 ore con doxibicina (2 μ g/ml) mantenuti in mezzo di coltura privo di steroidi per 5 giorni. Le cellule sono state lavate con PBS 1X freddo contenente 0,1% EDTA, raccolte e centrifugate a 3000 rpm per 5 minuti a 4°C. I *pellet* cellulari così ottenuti sono stati risospesi in 3 volumi di *buffer* ipotonico [(HB 1X): 20mM Hepes pH 7.5, 5mM NaF, 10 μ M Na₂MoO₄, 0,1mM EDTA, 1mM ditiotreitolo (DTT), 1mM Phenilmetil sulfonil fluoride (PMSF), 1X inibitori di proteasi] rispetto al *pellet* cellulare, al fine di facilitare la rottura della membrana plasmatica per osmosi. I campioni sono stati incubati in ghiaccio per 15 minuti per favorire la lisi, quindi è stato aggiunto 0,5% Triton X-100 soltanto immediatamente prima di effettuare la separazione delle componenti citosoliche da quelle nucleari mediante centrifugazione per 30 secondi a 13000 rpm. Il surnatante ottenuto dopo centrifugazione (citosol) è stato ulteriormente centrifugato per 30 minuti alla massima velocità, per permettere la sedimentazione di organelli quali i lisosomi, ed utilizzato per effettuare gli esperimenti di co-immunoprecipitazione successivi.

Per l'immunoprecipitazione di AGO2, le proteine citosoliche sono state incubate con l'anticorpo anti-AGO2 (ab57113, *Abcam*) *over-night* a 4°C in rotazione. Al campione è stata poi aggiunta la proteina A/G-agarosio, con successiva incubazione di 1 ora a 4°C in rotazione. Per l'immunoprecipitazione di MycFlag-RE β l'estratto proteico è stato incubato per 3 ore a 4°C in rotazione con la resina EZviewTM Red Anti-c-Myc Affinity Gel (*Sigma-Aldrich*). Le proteine immunoprecipitate sono state analizzate mediante *Western Blot*.

Le analisi di SDS-PAGE e *Western blot* sono state eseguite usando protocolli standard (*Nassa et al. 2014*) ed utilizzando i seguenti anticorpi primari: anti- β actina (A1978, *Sigma Aldrich*); anti-AGO1 (07-599 *Millipore*); anti-AGO2 (ab57113, *Abcam*); anti-TRBP2 (SC-292550, *Santa Cruz Biotechnology*); anti-Dicer (ab14601, *Abcam*); anti-AGO3 (ab3593, *Abcam*); anti-GW182 (ab84403, *Abcam*); anti-CNOT1(14276-1-AP, *Proteintech*), anti-Myc Tag clone 4A6 (05-724, *Millipore*).

6.8 Proteomica quantitativa e analisi dati

Per valutare gli effetti dell'attivazione sul proteoma piastrinico, è stata condotta un'estrazione proteica totale a partire da piastrine attivate con TRAP e COLL e dai controlli T0 (controllo basale), come descritto in precedenza. 10 μ g di estratto proteico totale ottenuto da ciascun volontario sono stati combinati in 2 gruppi da 75 μ g di proteine l'uno (replicati biologici).

I 2 gruppi di campioni sono stati sottoposti ad analisi di proteomica quantitativa iTRAQ (*isobaric Tag for Relative Quantitation*), in collaborazione con l'Istituto di Biotecnologie dell'Università di Helsinki. Ciascun replicato biologico è stato analizzato

due volte (replicati tecnici) mediante cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa (LC-MS/MS). I dati derivati dai singoli replicati sono stati analizzati insieme, per aumentare l'affidabilità e la solidità dei risultati ottenuti.

L'identificazione proteica e la quantizzazione relativa sono state eseguite con algoritmo di ricerca *Paragon*, usando *Protein Pilot 4 interface* (*Applied Biosystem*). Le ricerche nelle banche dati sono state effettuate per sequenze proteiche umane nel database *Uniprot* (versione 120813 con 20231 *human entries*).

6.9 Proximity Ligation Assay

Il saggio PLA *in vivo* è stato effettuato in cellule MCF-7 wt cresciute in condizioni di deprivazione ormonale per 5 giorni e transfettate in maniera transiente con plasmidi esprimenti myc-AGO2 e/o flag-RE β . Cellule non transfettate sono state usate come controllo.

Le cellule sono state lavate con PBS freddo, fissate con paraformaldeide al 4% per 20 minuti e successivamente sono state permeabilizzate per 5 minuti con Triton-X100 allo 0.2%. Il saggio di proximity ligation è stato effettuato seguendo il protocollo standard *Duolink® using PLA® Technology*. Come anticorpi primari sono stati usati rabbit anti-Flag Tag (F7425, *Sigma*) e mouse anti-Myc Tag clone 4A6 (05-724, *Millipore*).

6.10 Immunoprecipitazione del RNA, sequenziamento e analisi dati

L'immunoprecipitazione del RNA (RIP) è stata effettuata secondo il protocollo di Keene et al. (2006) sui cloni inducibili *MycFlag-RE β* cresciuti per 5 giorni in mezzo di coltura privo di rosso fenolo e complementato con 5% FBS trattato con DCC e sono state stimolate per 24 ore con doxiciclina (2 μ g/ml).

Le cellule sono state lavate, raccolte e lisate in *Polysome Lysis Buffer* (100mM KCl, 5mM MgCl₂, 10 mM HEPES pH 7.0, 0,5% NP-40, 1mM DTT, 100 unità/ml di *Rnase Inhibitor*, 400 μ M VRC, 1X *protease inhibitor cocktail*). 10 μ g di anticorpo sono stati incubati con la resina *Protein A/G Plus-Agarose* (*Santa-Cruz*) *over-night* a 4°C in rotazione. Per immunoprecipitare AGO2 e RE β sono stati usati gli anticorpi anti-AGO2 (ab57113, *Abcam*) e anti-Myc Tag clone 4A6 (05-724, *Millipore*) rispettivamente. IgG sono state usate come controllo negativo. 2mg di estratto proteico sono stati incubati per 4 ore a 4°C in rotazione con la Proteina A/G coniugata con l'anticorpo; un'aliquota di campione iniziale (*input*) non è stata sottoposta ad immunoprecipitazione ed è stata usata come controllo. I lavaggi sono stati eseguiti come da protocollo e l'RNA è stato estratto con il metodo TRIzol (*Life Technologies*). La preparazione di librerie di RNA e *smallRNA*, il sequenziamento e l'analisi dei dati ottenuti sono state eseguite come descritto in precedenza.

6.11 Gene Ontology e analisi funzionali

Le analisi funzionali dei trascritti, delle proteine e dei *target* predetti *in silico* di miRNA e piRNA sono state eseguite usando i software FIDEA (*D'Andrea et al. 2013*) e *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA; *Ingenuity Systems*, www.ingenuity.com). Il tool FIDEA *Gene Ontology Biological Process* (GO-BP) è stato applicato per estrapolare e

visualizzare i termini arricchiti. Per quanto concerne IPA, il *tool* “*Core Analysis*” è stato usato per ottenere le funzioni e i *pathway* arricchiti. Infine, l'applicazione “*MicroRNAs Target Filter*” è stata usata per ottenere gli mRNA e le proteine bersaglio dei miRNA e dei piRNA di interesse nei *pathway* selezionati

Ambrosino C, Tarallo R, Bamundo A et al. Identification of a hormone-regulated dynamic nuclear actin network associated with estrogen receptor alpha in human breast cancer cell nuclei. *Mol Cell Proteomics* 2010; 9:1352-1367.

Andersen H, Greenberg DL, Fujikawa K, Xu W, Chung DW, Davie EW. Protease-activated receptor 1 is the primary mediator of thrombin-stimulated platelet procoagulant activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Sep 28;96(20):11189-93.

Aravin AA, Hannon GJ, Brennecke J. The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science.* 2007 Nov 2;318(5851):761-4.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004; 116:281-97.

Belsito-Petrizzi V, Cicatiello L, Altucci L, Addeo R, Borgo R, Cancemi M, Ancora M, Leyva J, Salerno R, Bresciani F, Weisz A. Transcriptional control of cell cycle progression by estrogen hormones: Regulation of Cyclin D1 gene promoter activity by ER α . In: Spiringer-Valang, New York. 2000; 206-19.

Bonadonna G and Valagussa P. Neoplasie della mammella. In: *Medicina oncologica. 6° edizione.* Bonadonna G, Robustelli della Cuna G. Masson, Milano. 1999, 719.

Boren T, Xiong Y, Hakam A, Wenham R, Apte S, Wei Z, Kamath S, Chen DT, Dressman H, Lancaster JM. MicroRNAs and their target messenger RNAs associated with endometrial carcinogenesis. *Gynecol Oncol.* 2008 Aug;110(2):206-15.

Bruchova H, Yoon D, Agarwal AM, Mendell J, Prchal JT. Regulated expression of microRNAs in normal and polycythemia vera erythropoiesis. *Exp Hematol.* 2007 Nov;35(11):1657-67.

Bruno G, Tarallo R, Nassa G, Cimmino G, Giurato G, De Filippo MR, Ravo M, Rizzo F, Salvati A, Conte S, Pellegrino G, Cirillo P, Calabrò P, Öhman T, Nyman TA, Golino P, Weisz A. *In vitro* Platelets Activation Determines a Post-Transcriptional Proteome Reorganization Mediated by microRNAs. *Proceeding of the 2nd Joint Meeting Congress of Pathology and Laboratory Diagnostics, September 17-20 2014, Palermo, Italy. Am. J. Pathol.* 184 (Suppl): pg. S21, Abs. HEM4. 2014.

Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 2;101(9):2999-3004.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Nov 26;99(24):15524-9.

Carninci P, Kasukawa T, Katayama S et al. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 2005; 309:1559–63.

Cartharius K, Frech K, Grote K et al. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 2005; 21:2933-2942.

Castanotto D, Lingeman R, Riggs AD, Rossi JJ. CRM1 mediates nuclear-cytoplasmic shuttling of mature microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Dec 22;106(51):21655-9.

Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science.* 2004 Jan 2;303(5654):83-6.

Cheng J, Guo JM, Xiao BX, Miao Y, Jiang Z, Zhou H, Li QN. piRNA, the new non-coding RNA, is aberrantly expressed in human cancer cells. *Clin Chim Acta.* 2011; 412:1621–1625.

Cheng J, Kapranov P, Drenkow J, Dike S, Brubaker S, Patel S, Long J, Stern D, Tammana H, Helt G, Sementchenko V, Piccolboni A, Bekiranov S, Bailey DK, Ganesh M, Ghosh S, Bell I, Gerhard DS, Gingeras TR. Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. *Science* 2005;308: 1149–54.

Chi SW, Hannon GJ, Darnell RB. An alternative mode of microRNA target recognition. *Nat Struct Mol Biol.* 2012 Feb 12;19(3):321-7.

Cicatiello L, Mutarelli M, Grober OM, Paris O, Ferraro L, Ravo M, Tarallo R, Luo S, Schroth GP, Seifert M, Zinser C, Chiusano ML, Traini A, De Bortoli M, Weisz A. Estrogen receptor alpha controls a gene network in luminal-like breast cancer cells comprising multiple transcription factors and microRNAs. *Am J Pathol.* 2010; 176:2113-30.

Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Sep 27;102(39):13944-9.

Cirillo P, Golino P, Ragni M, Battaglia C, Pacifico F, Formisano S, Buono C, Condorelli M, Chiariello M. Activated platelets and leucocytes cooperatively stimulate smooth muscle cell proliferation and proto-oncogene expression via release of soluble growth factors. *Cardiovasc Res.* 1999 Jul;43(1):210-8.

Coller BS. Platelets in cardiovascular thrombosis and thrombolysis. In: Fozzard HA, Haber E, Jennings RB, Katz AM, Morgan HE, eds. *The heart and cardiovascular system.* New York, NY: Raven Press, 1993; 219-75.

Croker BA, Kiu H, Nicholson SE. SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Semin Cell Dev Biol.* 2008; 19:414–422

Davis BN, Hilyard AC, Lagna G, Hata A. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature*. 2008 Jul 3;454(7200):56-61.

Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S, Tilgner H, Guernec G, Martin D, Merkel A, Knowles DG, Lagarde J, Veeravalli L, Ruan X, Ruan Y, Lassmann T, Carninci P, Brown JB, Lipovich L, Gonzalez JM, Thomas M, Davis CA, Shiekhattar R, Gingeras TR, Hubbard TJ, Notredame C, Harrow J, Guigó R. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res* 2012; 22: 1775–89.

Déry O, Corvera CU, Steinhoff M, Bunnett NW. Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am J Physiol*. 1998 Jun;274(6 Pt 1):C1429-52.

Dieci G, Preti M, Montanini B. Eukaryotic snoRNAs: a paradigm for gene expression flexibility. *Genomics*. 2009 Aug;94(2):83-8.

Djebali S, Davis CA, Merkel A et al. Landscape of transcription in human cells. *Nature* 2012; 489: 101–8.

Dowdy SC, Gostout BS, Shridhar V, Wu X, Smith DI, Podratz KC, Jiang SW. Biallelic methylation and silencing of paternally expressed gene 3 (PEG3) in gynecologic cancer cell lines. *Gynecol Oncol*. 2005; 99:126–134.

Edelstein LC, McKenzie SE, Shaw C, Holinstat MA, Kunapuli SP, Bray PF. MicroRNAs in platelet production and activation. *J Thromb Haemost*. 2013 Jun;11 Suppl 1:340-50.

Emons G, Fleckenstein G, Hinney B, Huschmand A, Heyl W. Hormonal interactions in endometrial cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2000 Dec;7(4):227-42.

Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell*. 2008 Jan 11;132(1):9-14.

Fazi F, Racanicchi S, Zardo G, Starnes LM, Mancini M, Travaglini L, Diverio D, Ammatuna E, Cimino G, Lo-Coco F, Grignani F, Nervi C. Epigenetic silencing of the myelopoiesis regulator microRNA-223 by the AML1/ETO oncoprotein. *Cancer Cell*. 2007 Nov;12(5):457-66.

Feng W, Marquez RT, Lu Z, Liu J, Lu KH, Issa JP, Fishman DM, Yu Y, Bast RC Jr. Imprinted tumor suppressor genes ARHI and PEG3 are the most frequently down-regulated in human ovarian cancers by loss of heterozygosity and promoter methylation. *Cancer*. 2008; 112:1489–1502.

Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C, Weber M, Hamm CW, Röxe T, Müller-Ardogan M, Bonauer A, Zeiher AM, Dimmeler S. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res*. 2010 Sep 3;107(5):677-84.

Freedman JE. A platelet transcriptome revolution. *Blood*. 2011 Oct 6;118(14):3760-1.

Friedlander MR, Chen W, Adamidi C, Maaskola J, Einspanier R, Knespel S, Rajewsky N. Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep. *Nat Biotechnol*. 2008; 26:407–415.

Friedlander MR, Mackowiak SD, Li N, Chen W, Rajewsky N. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Res*. 2012; 40:37–52.

Fukuda T, Yamagata K, Fujiyama S, Matsumoto T, Koshida I, Yoshimura K, Mihara M, Naitou M, Endoh H, Nakamura T, Akimoto C, Yamamoto Y, Katagiri T, Foulds C, Takezawa S, Kitagawa H, Takeyama K, O'Malley BW, Kato S. DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs. *Nat Cell Biol*. 2007 May;9(5):604-11.

Gachet C. P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thromb Haemost*. 2008 Mar;99(3):466-72.

Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Med* 2009, 60:167–179.

Georgantas RW 3rd, Hildreth R, Morisot S, Alder J, Liu CG, Heimfeld S, Calin GA, Croce CM, Civin CI. CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb 20;104(8):2750-5.

Ginsberg MH, Du X, O'Toole TE, Loftus JC. Platelet integrins. *Thromb Haemost*. 1995 Jul;74(1):352-9.

Giurato G, Tarallo R, Bruno G, Salvati A, Nassa G, Ravo M, Rizzo F, Weisz A. Identification of RNAs specifically associated to ER β and AGO2 proteins in breast cancer cells. Proceeding for the Twelfth Annual Meeting of the Bioinformatics Italian Society, 3-5 June 2015, Milan (Italy). *In press*.

Giurato G, De Filippo MR, Rinaldi A, Hashim A, Nassa G, Ravo M, Rizzo F, Tarallo R, Weisz A. iMir: an integrated pipeline for high-throughput analysis of small non-coding RNA data obtained by smallRNA-Seq. *BMC Bioinformatics*. 2013; 14:362.

Grober OMV, Mutarelli M, Giurato G, Ravo M, Cicatiello L, De Filippo MR, Ferraro L, Nassa G, Papa MF, Paris O, Tarallo R, Luo S, Schroth G, Benes V, Weisz A. Global analysis of estrogen receptor beta binding to breast cancer cell genome reveals an extensive interplay with estrogen receptor alpha for target gene regulation. *BMC Genomics*. 2011; 14:12-36.

Guil S, Cáceres JF. The multifunctional RNA-binding protein hnRNP A1 is required for processing of miR-18a. *Nat Struct Mol Biol*. 2007 Jul;14(7):591-6.

Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 2000 Mar 16;404(6775):293-6.

Harris KS, Zhang Z, McManus MT, Harfe BD, Sun X. Dicer function is essential for lung epithelium morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb 14;103(7):2208-13.

Hartman J, Ström A, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta in breast cancer--diagnostic and therapeutic implications. *Steroids*. 2009; 74:635-41.

Heimberg AM, Sempere LF, Moy VN, Donoghue PC, Peterson KJ. MicroRNAs and the advent of vertebrate morphological complexity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Feb 26;105(8):2946-50.

Hirota T, Morisaki T, Nishiyama Y, Marumoto T, Tada K, Hara T, Masuko N, Inagaki M, Hatakeyama K, Saya H. Zyxin, a regulator of actin filament assembly, targets the mitotic apparatus by interacting with h-warts/LATS1 tumor suppressor. *J Cell Biol*. 2000 May 29;149(5):1073-86.

Hollenberg MD, Saifeddine M, al-Ani B, Kawabata A. Proteinase-activated receptors: structural requirements for activity, receptor cross-reactivity, and receptorselectivity of receptor-activating peptides. *Can J Physiol Pharmacol*. 1997 Jul;75(7):832-41.

Huang B, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptors in breast carcinogenesis and endocrine therapy. *Mol Cell Endocrinol*. 2014 Nov 26. pii: S0303-7207(14)00371-2.

Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*. 2002 Sep 20;297(5589):2056-60.

Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, Kahn ML, Zheng YW, Timmons C, Tram T, Coughlin SR. Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature*. 1997 Apr 3;386(6624):502-6

Jensen EV, De Sombre ER. Mechanism of action of the females sex hormones. *Annual Review of Biochemistry*. 1972; 41:203-230.

Jiang X, Yu Y, Yang HW, Agar NY, Frado L, Johnson MD. The imprinted gene PEG3 inhibits Wnt signaling and regulates glioma growth. *J Biol Chem*. 2010; 285:8472–8480.

John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human MicroRNA targets. *PLoS Biol*. 2004; 2:e363.

Kalampokas T, Sofoudis C, Anastasopoulos C, Boutas I, Melloy S, Kondi-Pafiti A, Kalampokas E, Botsis D, Salakos N. Effect of tamoxifen on postmenopausal endometrium. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2013;34(4):325-8.

Karube Y, Tanaka H, Osada H, Tomida S, Tatematsu Y, Yanagisawa K, Yatabe Y, Takamizawa J, Miyoshi S, Mitsudomi T, Takahashi T. Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci.* 2005 Feb;96(2):111-5.

Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Feb;10(2):126-39.

Kim Y, Kim VN. MicroRNA factory: RISC assembly from precursor microRNAs. *Mol Cell.* 2012 May 25;46(4):384-6.

Kirino Y, Mourelatos Z. Mouse Piwi-interacting RNAs are 2'-O-methylated at their 3' termini. *Nat Struct Mol Biol.* 2007 Apr;14(4):347-8.

Koehler KF, Helguero LA, Haldosén LA, Warner M, Gustafsson JA. Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta. *Endocr Rev.* 2005; 26:465-78.

Kohda T, Asai A, Kuroiwa Y, Kobayashi S, Aisaka K, Nagashima G, Yoshida MC, Kondo Y, Kagiyama N, Kirino T, Kaneko-Ishino T, Ishino F. Tumour suppressor activity of human imprinted gene PEG3 in a glioma cell line. *Genes Cells.* 2001; 6:237-247.

Kondkar AA, Bray MS, Leal SM, Nagalla S, Liu DJ, Jin Y, Dong JF, Ren Q, Whiteheart SW, Shaw C, Bray PF. VAMP8/endobrevin is overexpressed in hyperreactive human platelets: suggested role for platelet microRNA. *J Thromb Haemost.* 2010 Feb;8(2):369-78.

Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin.* 1999 Jan-Feb;49(1):8-31, 1.

Landry P, Plante I, Ouellet DL, Perron MP, Rousseau G, Provost P. Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets. *Nat Struct Mol Biol.* 2009 Sep;16(9):961-6.

Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 2009; 10:R25.

Lanza F, Morales M, de La Salle C, Cazenave JP, Clemetson KJ, Shimomura T, Phillips DR. Cloning and characterization of the gene encoding the human platelet glycoprotein V. A member of the leucine-rich glycoprotein family cleaved during thrombin-induced platelet activation. *J Biol Chem.* 1993 Oct 5;268(28):20801-7.

Madeira M, Mattar A, Logullo AF, Soares FA, Gebrim LH. Estrogen receptor alpha/beta ratio and estrogen receptor beta as predictors of endocrine therapy responsiveness-a randomized neoadjuvant trial comparison between anastrozole and tamoxifen for the treatment of postmenopausal breast cancer. *BMC Cancer* 2013; 13:425.

Mangalpally KK, Siqueiros-Garcia A, Vaduganathan M, Dong JF, Kleiman NS, Guthikonda S. Platelet activation patterns in platelet size sub-populations: differential responses to aspirin in vitro. *J Thromb Thrombolysis*. 2010 Oct;30(3):251-62.

McManus DD, Freedman JE. MicroRNAs in platelet function and cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*. 2015 Dec;12(12):711-7.

Mei Y, Clark D, Mao L. Novel dimensions of piRNAs in cancer. *Cancer Lett*. 2013 Aug 9;336(1):46-52.

Michlewski G, Guil S, Semple CA, Cáceres JF. Posttranscriptional regulation of miRNAs harboring conserved terminal loops. *Mol Cell*. 2008 Nov 7;32(3):383-93.

Monticelli S, Ansel KM, Xiao C, Socci ND, Krichevsky AM, Thai TH, Rajewsky N, Marks DS, Sander C, Rajewsky K, Rao A, Kosik KS. MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system. *Genome Biol*. 2005;6(8):R71.

Nassa G, Tarallo R, Giurato G, De Filippo MR, Ravo M, Rizzo F, Stellato C, Ambrosino C, Baumann M, Lietzèn N, Nyman TA, Weisz A. Post-transcriptional regulation of human breast cancer cell proteome by unliganded estrogen receptor β via microRNAs. *Mol Cell Proteomics*. 2014 Apr;13(4):1076-90.

Nelson LR, Bulun SE. Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol*. 2001 Sep;45(3 Suppl):S116-24.

Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev*. 2001; 81:1535-65.

O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Boldin MP, Taganov KD, Nicoll J, Paquette RL, Baltimore D. Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *J Exp Med*. 2008 Mar 17;205(3):585-94.

Paris O, Ferraro L, Grober OM, Ravo M, De Filippo MR, Giurato G, Nassa G, Tarallo R, Cantarella C, Rizzo F, Di Benedetto A, Mottolese M, Benes V, Ambrosino C, Nola E, Weisz A. Direct regulation of microRNA biogenesis and expression by estrogen receptor beta in hormone-responsive breast cancer. *Oncogene*. 2012 Sep 20;31(38):4196-206.

Plé H, Landry P, Benham A, Coarfa C, Gunaratne PH, Provost P. The repertoire and features of human platelet microRNAs. *PLoS One*. 2012;7(12):e50746.

Pontieri, Russo, Frati, *Patologia generale*. Piccin 3° edizione 2005; 760-765.

Qiu X, Zheng J, Guo X, Gao X, Liu H, Tu Y, Zhang Y. Reduced expression of SOCS2 and SOCS6 in hepatocellular carcinoma correlates with aggressive tumor progression and poor prognosis. *Mol Cell Biochem*. 2013; 378:99–106.

Raaijmakers MH, Mukherjee S, Guo S, Zhang S, Kobayashi T, Schoonmaker JA, Ebert BL, Al-Shahrour F, Hasserjian RP, Scadden EO, Aung Z, Matza M, Merckenschlager M, Lin C, Rommens JM, Scadden DT. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature*. 2010 Apr 8;464(7290):852-7.

Ravanat C, Morales M, Azorsa DO, Moog S, Schuhler S, Grunert P, Loew D, Van Dorsselaer A, Cazenave JP, Lanza F. Gene cloning of rat and mouse platelet glycoprotein V: identification of megakaryocyte-specific promoters and demonstration of functional thrombin cleavage. *Blood*. 1997 May 1;89(9):3253-62.

Ravo M, Cordella A, Rinaldi A, Bruno G, Alexandrova E, Saggese P, Nassa G, Giurato G, Tarallo R, Marchese G, Rizzo F, Stellato C, Biancardi R, Troisi J, Di Spiezio Sardo A, Zullo F, Weisz A, Guida M. Small non-coding RNA deregulation in endometrial carcinogenesis. *Oncotarget*. 2015 Mar 10;6(7):4677-91

Relaix F, Wei X, Li W, Pan J, Lin Y, Bowtell DD, Sassoon DA, Wu X. Pw1/Peg3 is a potential cell death mediator and cooperates with Siah1a in p53-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97:2105–2110.

Ren XP, Wu J, Wang X, Sartor MA, Qian J, Jones K, Nicolaou P, Pritchard TJ, Fan GC. MicroRNA-320 is involved in the regulation of cardiac ischemia/reperfusion injury by targeting heat-shock protein20. *Circulation*. 2009 May 5;119(17):2357-66.

Ren XP, Wu J, Wang X, Sartor MA, Qian J, Jones K, Nicolaou P, Pritchard TJ, Fan GC. MicroRNA-320 is involved in the regulation of cardiac ischemia/reperfusion injury by targeting heat-shock protein20. *Circulation*. 2009 May 5;119(17):2357-66.

Rice KL, Licht JD. HOX deregulation in acute myeloid leukemia. *J Clin Invest*. 2007; 117:865–868.

Risinger JI, Maxwell GL, Chandramouli GV, Jazaeri A, Aprelikova O, Patterson T, Berchuck A, Barrett JC. Microarray analysis reveals distinct gene expression profiles among different histologic types of endometrial cancer. *Cancer Res*. 2003; 63:6–11.

Rizzo F, Hashim A, Marchese G, Ravo M, Tarallo R, Nassa G, Giurato G, Rinaldi A, Cordella A, Persico M, Sulas P, Perra A, Ledda-Columbano GM, Columbano A, Weisz A. Timed regulation of P-element-induced wimpy testis-interacting RNA expression during rat liver regeneration. *Hepatology*. 2014; 60:798–806.

Robbins e Cotran. *Le basi patologiche delle malattie*. Editore Elsevier. 7° edizione 2006; 1120-54.

Roberts TC. The MicroRNA Biology of the Mammalian Nucleus. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2014 Aug 19;3:e188.

Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 2004 Oct;14(10A):1902-10.

Roger P, Sahla ME, Mäkelä S, Gustafsson JA, Baldet P, Rochefort H. Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Res.* 2001; 61:2537-41.

Rosati P, Colombo R, Maraldi N. *Istologia*. Edi. Ermes. V edizione, 2006.

Sener A, Egemen G, Cevik O, et al. In vitro effects of nitric oxide donors on apoptosis and oxidative/nitrative protein modifications in ADP-activated platelets. *Human Exp Toxicol* 2013; 32: 225–235.

Setiawan VW et al. Type I and II endometrial cancers: have they different risk factors? *J Clin Oncol.* 2013 Jul 10;31(20):2607-18.

Singh SK, Pal Bhadra M, Girschick HJ, Bhadra U. MicroRNAs--micro in size but macro in function. *FEBS J.* 2008; 275:4929-44.

Starczynowski DT, Kuchenbauer F, Argiropoulos B, Sung S, Morin R, Muranyi A, Hirst M, Hogge D, Marra M, Wells RA, Buckstein R, Lam W, Humphries RK, Karsan A. Identification of miR-145 and miR-146a as mediators of the 5q-syndrome phenotype. *Nat Med* 2010; 16: 49–58.

Starega-Roslan J, Krol J, Koscianska E, Kozlowski P, Szlachcic WJ, Sobczak K, Krzyzosiak WJ. Structural basis of microRNA length variety. *Nucleic Acids Res.* 2011 Jan;39(1):257-68.

Tarallo R, Giurato G, Bruno G, Ravo M, Rizzo F, Salvati A, Ricciardi L, Marchese G, Cordella A, Nyman TA, Milanesi L, Nassa G, Weisz A. Unliganded Estrogen Receptor Beta cooperates with Argonaute 2 in the modulation of transcription rate and splicing of target genes in breast cancer cells. *Manoscritto in preparazione.*

Tay Y, Zhang J, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature.* 2008 Oct 23;455(7216):1124-8.

Thomson JM, Newman M, Parker JS, Morin-Kensicki EM, Wright T, Hammond SM. Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev.* 2006 Aug 15;20(16):2202-7.

Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliensky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JT, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU, Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J, Engelhardt S. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature.* 2008 Dec 18;456(7224):980-4.

Thum T, Catalucci D, Bauersachs J. MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease. *Cardiovasc Res* 2008;79:562-570.

Trapnell C, Roberts A, Goff L et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc* 2012; 7:562-578.

Vagin VV, Sigova A, Li C, Seitz H, Gvozdev V, Zamore PD. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science*. 2006 Jul 21;313(5785):320-4.

Vivar OI, Zhao X, Saunier EF, Griffin C, Mayba OS, Tagliaferri M, Cohen I, Speed TP, Leitman DC. Estrogen receptor beta binds to and regulates three distinct classes of target genes. *J Biol Chem*. 2010; 285:22059-66.

Wahlestedt C. Targeting long non-coding RNA to therapeutically upregulate gene expression. *Nat Rev Drug Discovery* 2013; 12:433–46.

Wang JX, Jiao JQ, Li Q, Long B, Wang K, Liu JP, Li YR, Li PF. miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1. *Nat Med*. 2011 Jan;17(1):71-8.

Watanabe T, Takeda A, Tsukiyama T, Mise K, Okuno T, Sasaki H, Minami N, Imai H. Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes. *Genes Dev*. 2006 Jul 1;20(13):1732-43.

Weber B, Stresemann C, Brueckner B, Lyko F. Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle*. 2007 May 2;6(9):1001-5.

Weinmann L, Höck J, Ivacevic T, Ohrt T, Mütze J, Schwille P, Kremmer E, Benes V, Urlaub H, Meister G. Importin 8 is a gene silencing factor that targets argonaute proteins to distinct mRNAs. *Cell*. 2009 Feb 6;136(3):496-507.

Weisz A, Bresciani F. Estrogen regulation of proto-oncogenes coding for nuclear proteins. *Crit Rev Oncog*. 1993; 4:361-88.

Wu W, Lin Z, Zhuang Z, Liang X. Expression profile of mammalian microRNAs in endometrioid adenocarcinoma. *Eur J Cancer Prev*. 2009 Feb;18(1):50-5.

Wu X, Chen H, Parker B, Rubin E, Zhu T, Lee JS, Argani P, Sukumar S. HOXB7, a homeodomain protein, is overexpressed in breast cancer and confers epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*. 2006; 66:9527–9534.

Yigit E, Batista PJ, Bei Y, Pang KM, Chen CC, Tolia NH, Joshua-Tor L, Mitani S, Simard MJ, Mello CC. Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi. *Cell*. 2006 Nov 17;127(4):747-57.

Zhu X, Leav I, Leung YK, Wu M, Liu Q, Gao Y, McNeal JE, Ho SM. Dynamic regulation of estrogen receptor-beta expression by DNA methylation during prostate cancer development and metastasis. *Am J Pathol.* 2004 Jun;164(6):2003-12.

“Nessuno di noi è giunto dove è unicamente per essersi issato da solo. Siamo qui perché qualcuno si è chinato e ci ha aiutato” cit. Thourgood Marshall

Voglio ringraziare a modo mio le persone che mi hanno accompagnata durante questo percorso di vita e che mi sono stati accanto nonostante i miei alti e bassi e nonostante le difficoltà.

Amore: Amore è quando mia madre mi accarezza teneramente dopo aver capito che qualcosa non va, sebbene io faccia finta di niente. Amore è vederla fiera di me nei momenti belli ma soprattutto in quelli brutti. Amore è quando cucina il brodino “solo per me” così mangio qualcosa di caldo, Amore sei tu mamma!

Dedizione: Dedizione al lavoro, alla famiglia, ai figli. Questo è mio padre! Dedizione è quando nonostante la stanchezza, il mal tempo, nonostante sia Natale o Pasqua va a lavorare per non farci mancare niente. Dedizione è ricevere il tubo di baci perugina a S. Valentino e la mimosa l'8 marzo, ricordandoci sempre che noi figlie e mamma siamo le donne della tua vita.

Sorellanza: Sorellanza è quando Simona il giorno del mio compleanno tappezza la casa di foto nostre per farmi una sorpresa, quando mi fa notare che col mascara sciolto sembro un panda, quando mi dice quasi in lacrime di volermi accanto nel giorno più bello della sua vita.

Sorellanza è quando Giovanna mi vede con una sua maglia addosso e fa finta di niente perché tanto sa che sono un caso disperato e quando a modo suo mi fa capire che nonostante le differenze caratteriali e le incomprensioni lei è lì e basta solo che io bussi alla porta della sua stanza, del suo mondo.

Famiglia: Famiglia è pensare ai miei nonni, con loro sono cresciuta e per me sono stati un esempio. Famiglia è riunirci a Natale con nonno Carmine che ci “spenna” a scala 40 mentre nonna Giovanna cerca il volontario per il caffè perché il suo è rinomatamente “acqua fresca”. Famiglia è quando insieme mi vengono a prendere all'uscita dal laboratorio, non importa a che ora e non importa se c'è da aspettare. Famiglia è chiamare e sentire nonna Antonietta che risponde “siiiiii” e poi vederla seduta sulla sua sedia mentre ricama, fin da quando sono nata.

Complicità: Complicità è quando Namy ed io ci capiamo solo guardandoci, quando la camera cellule diventa un po' il nostro confessionale, quando ridiamo insieme delle nostre tante paranoie, ansie ed insicurezze. Complicità è rispondere senza che l'altra abbia fatto la domanda, complicità è essere sé stesse e non sentirsi giudicate!

Tenerezza: Tenerezza è quando Salvina mi guarda con gli occhioni spalancati e mi dice “Ohhh Giusina!”, è ricordare luglio 2014 come le “ChIPPeeeeee” ed “è sabbbbatoooo”. quanti bei momenti trascorsi insieme! Tenerezza è quando la sento vicina pur essendo lontane. Tenerezza è scoprire che dietro la sua riservatezza si cela una persona solare e determinata...la mia Secchiola.

Forza: Forza è quando Valentina mi dà coraggio e supporto nei momenti di difficoltà. Forza è sapere che sulla mia Stalkera posso sempre contare. Forza è vedere come

Ringraziamenti

affronta i problemi della vita col sorriso senza mai abbattersi. Forza è quando un suo abbraccio ti riempie il cuore!

Condivisione: Condivisione è quando trascorri 4 anni della tua vita nel LabMedMolGe e ti accorgi di avere una seconda famiglia!

Condivisione è quando il Prof.Weisz sprona a fare sempre meglio, quando porta la cioccolata da conservare nei momenti in cui ne abbiamo bisogno ma che puntualmente finisce subito perché “in laboratorio ci sono le cavallette!”

Condivisione è quando Roberta, tra le tante cose da fare, trova sempre il tempo di aiutarmi, di correggere abstract e relazioni varie. Condivisione è quando ti arrivano le sue e-mail a qualsiasi ora del giorno e della notte, è sapere che su di lei posso contare e che sono tante le cose che ancora mi può insegnare.

Condivisione è quando Maria, Gnassa, Giorgio e Frizzo hanno sempre un minuto per ascoltare le mie domande e per aiutarmi quando ne ho bisogno. Condivisione è quando Maria mi dice “presto e bene non vanno insieme” o “quando scongeli, ditilla e spinnal!”. Condivisione è quando Gnassa mi porta un foglio stampato con scritto “un secolo di ChIP-seq” o quando mi chiama “Giusoooo”. Condivisione è quando Giorgio porta i dolci buonissimi siciliani e quando dice di voler comprare l’ennesima cravatta per un’occasione, condivisione è riuscire a far capire al Dott.Giurato che le cravatte non sono monouso! Condivisione è chiedere il parere di Frizzo perché io di chimica proprio non ci capisco niente.

Condivisione è sentire Cangy ridere e ridere a tua volta perché non ne puoi fare a meno, soprattutto quando ti accorgi che “kist so cinmmm!!!”. Condivisione è essere a tavola tutti insieme, ascoltare super-Domenico-Quark e vedere le facce della Marchesa seduta di fronte a me. Condivisione è aprire il bar Brunaldi, che ogni giorno trova un diverso stagista a cui far fare il caffè. Condivisione è quando il Rinaldi diventa il tuo socio nonché formattatore di tesi ufficiale.

Condivisione è quando Robertina spunta all’improvviso e ti chiede “che fai?”, dolcissima e tenerissima come solo lei sa essere. Condivisione è chiamare “Coooo” che a sua volta ti risponde “è fessss” in lingua potentina!

Condividere tutto questo ogni giorno con voi aiuta a rendere meno pesante il lavoro. Vi voglio bene!

Disponibilità: Disponibilità è quando la Prof.ssa Esposito ha accettato di essere il mio Tutor, dandomi fiducia ed incoraggiamento.

Sono stati 3 anni impegnativi ed intensi, fatti di momenti di sconforto ma al tempo stesso di soddisfazioni. Grazie a tutti voi per aver contribuito a rendere questo percorso della mia vita indimenticabile!