

Frontiere
a cura di A. Cao, A. Iolascon, L.D.
Notarangelo

Ruolo dei microRNAs in medicina

M. ZOLLO^{***}, I. ANDOLFO^{*}, L. GARZIA^{*}, P. CAROTENUTO^{*}, A. IOLASCON^{***}

^{*} CEINGE, Centro di Ingegneria Genetica e Biotecnologia Avanzate, Napoli;

^{*} Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie mediche, DBBM,
Università "Federico II", Napoli

Riassunto

L'evoluzione degli organismi multicellulari è accompagnata da un progressivo aumento della complessità dei meccanismi di regolazione genica. Questa rapida evoluzione è evidente a livello della regolazione trascrizionale, dove si osserva la veloce espansione delle famiglie dei fattori trascrizionali, mentre a livello post-trascrizionale tra i nuovi meccanismi di regolazione è nota oggi una nuova famiglia di geni regolatori: i microRNAs. Diversi gruppi di ricerca nel mondo sono impegnati nello studio di queste piccole molecole di RNA che regolano i più importanti meccanismi biologici tra cui proliferazione, differenziamento ed apoptosi. I microRNAs sono molto promettenti in future applicazioni di terapia clinica visto il loro ruolo di regolazione simultanea di più geni/proteine.

Summary

The emergence of complex, multicellular organism was accompanied, and perhaps facilitated by dramatic increases in the complexity of gene regulatory mechanisms. At the level of transcriptional regulation, this can be clearly seen in the massive expansion of transcription-factor families and the pervasive combinatorial control of genes by multiple transcription factor in higher organism. At the level of posttranscriptional control, entirely new mechanisms of gene regulation arose, typified by a large and growing class of non coding RNAs known as microRNAs. Many researcher groups are studying the small RNAs that could regulate many biological mechanisms and become future therapeutic targets following the hypothesis "one hit-multiple targets approach".

Metodologia seguita

Le fonti bibliografiche alla base di tale revisione sono state tratte da ricer-

che in PubMed, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=PubMed>) inserendo come parole chiave: "miRs"; "miRs and therapy", "miRs and biogenesis", "miRs and pathology" e "miRs and oncogene". Le ricerche bibliografiche sono state effettuate fino al 30 maggio 2007. Accanto a pubblicazioni *peer-reviewed* sono state prese in considerazione revisioni redatte da autorevoli ricercatori del settore.

Obiettivi

L'articolo descrive i più rilevanti sviluppi nel campo della regolazione genica con particolare attenzione alla famiglia dei microRNAs, al loro meccanismo di azione e alle prospettive più promettenti nel campo delle applicazioni nella terapia clinica.

Regolazione genica e microRNAs

I microRNAs (miRs, miRNAs) costituiscono una grande famiglia di geni regolatori, formata da piccole molecole di RNA, a singolo filamento, di circa 22 nucleotidi, non codificanti per proteine, abbondantemente espressi nelle piante e negli animali (Bartel et al., 2004). Il primo miR scoperto è stato lin-4, identificato da Gary Ruvkun et al. in *C. elegans*. La scoperta del secondo miR in *C. elegans*, miR let-7, suggerì l'esistenza di un grande gruppo di geni regolatori. Oggi si stima che essi rappresentino tra l'1%-5% dei geni nei mammiferi; infatti, centinaia di miRs sono stati identificati e più di mille sono stati predetti con metodi computazionali. Nel 2003 la rapida crescita del numero di miRNAs

identificati spinse Sam Griffiths-Jones dell'Istituto Sanger a creare un database in cui catalogare tutte le sequenze dei miRNAs conosciuti (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences>). In questo registro i miRNAs sono catalogati con un numero identificativo basato sulla similarità della sequenza. Le forme mature identiche sono annotate con lo stesso nome ma se sono prodotte da loci genomici diversi sono differenziate da un suffisso (es. "miR-16-1" e "miR-16-2"). Differenze di 2 basi sono identificate da un altro suffisso (es. "miR-181a" and "miR-181b"). Inoltre, in questo registro sono annotate le localizzazioni genomiche di ogni singolo miRNA, le sequenze omologhe tra le specie (Di Leva G et al., 2006).

I miRNAs sono essenziali per il normale sviluppo di tutti i tessuti, in quanto controllano i più importanti processi biologici quali: crescita cellulare, differenziamento, metabolismo ed apoptosi (Esquela-Kerscher et al., 2006). Ad esempio, in *Drosophila* il miR-14 previene la morte cellulare ed è richiesto per un normale metabolismo dei lipidi; il miR-125b e il miR let-7 controllano la proliferazione cellulare; il miR-181 è coinvolto nello sviluppo della linea ematopoietica dei linfociti B (Harfe et al., 2005). I miR-15a e miR-16-1 promuovono la sopravvivenza delle cellule immunitarie B; il miR-375 è coinvolto nella secrezione dell'insulina e il miR-143 promuove lo sviluppo degli adipociti (Harfe et al., 2005; Hwang et al., 2006; Miska et al., 2005).

I meccanismi attraverso i quali i miRs svolgono la loro funzione di regolatori dell'espressione genica nell'uomo sono ancora in corso di studio. Il primo meccanismo analizzato fu quello presente in *C. Elegans*, in cui la quantità degli mRNA

regolati da miRs fu trovata invariata mentre la quantità delle proteine targets di miRs altamente ridotta (Olsen et al., 1999). Questa osservazione fece ipotizzare che i miRs potessero svolgere la loro funzione a livello della sintesi proteica. Diversi altri studi hanno supportato tale ipotesi: Maroney et al. (2006) hanno dimostrato che diversi mRNA regolati da miRs nella linea cellulare umana Hela sono associati al polisoma cioè ai ribosomi legati all'mRNA durante la fase di elongazione della sintesi proteica; Nottrott et al. (2006) hanno dimostrato, inoltre, che il miR Let7-a è associato al polisoma durante la traduzione in diverse linee cellulari umane, mentre i polipeptidi nascenti non sono stati ritrovati mediante saggi di immunoprecipitazione, suggerendo che la repressione traduzionale è il risultato della degradazione proteica durante la fase di elongazione. In letteratura sono presenti altri lavori che evidenziano una regolazione genica dei miRs anche a livello della degradazione dell'mRNA target (gene legato e regolato dal miRNA), meccanismo operato dai miRs presenti nelle piante (Bagga et al., 2005; Lim et al., 2005). Oramai è chiaro che il meccanismo di destabilizzazione dell'mRNA mediato dal miR consiste in una de-adenilazione seguita dalla rimozione del cap all'estremità 5' tramite il reclutamento di un complesso di enzimi cellulari. Per la loro grandezza e funzione i miRNAs ricordano gli siRNAs (*short interfering RNA*) piccole molecole di RNA a doppio filamento di circa 21-22 nucleotidi, che negli organismi invertebrati legano in maniera perfettamente complementare l'mRNA target e ne inibiscono la funzione attraverso il meccanismo dell'RNA *interference* (iRNA). Que-

sto meccanismo fu identificato nel 1998 da due ricercatori Fire e Mello tramite la scoperta che una miscela di doppi filamenti di RNA è più efficace nell'inibire l'espressione genica rispetto ad un singolo filamento, nel nematode *C. Elegans*. Subito dopo fu scoperto che questo meccanismo è presente in tutti gli organismi eucariotici ed anche nelle cellule di mammifero (Agrawal, 2004). I miRNAs e gli siRNAs derivano da distinti precursori: lunghe molecole di RNA a doppio filamento (centinaia di migliaia di basi) per i siRNAs e piccole molecole con struttura a forcina di 70-80 nucleotidi (il pre-miR) per i miRs. La biogenesi e la funzione di entrambe le classi di piccoli RNA richiede fattori in comune: l'endonucleasi Dicer, le proteine della famiglia Argonata ed il complesso RISC. Le lunghe molecole di RNA a doppio filamento sono processate in siRNAs tramite l'azione dell'enzima DICER (una endonucleasi specifica per i doppi filamenti di RNA). I siRNAs risultanti sono incorporati nel complesso di silenziamento genico RISC che ne guida l'interazione con l'RNA target omologo e tramite le proteine Argonata ne promuove la degradazione. Il legame dei siRNA avviene sull'mRNA e non nella regione 3'UTR del gene target come per i miRNAs ed inoltre i siRNAs inibiscono la funzione del gene target tramite la degradazione dell'mRNA mentre i miRNAs tramite l'inibizione della traduzione (Agrawal, 2004). La funzione naturale dell'iRNA sembra essersi evoluta come meccanismo di difesa contro elementi genetici mobili, trasposoni e virus. I ricercatori continuano incessantemente nello studio di questo meccanismo che è implicato nella regolazione genica ed anche come possibile meccani-

simo di difesa contro i virus visto che questi hanno sviluppato strategie contro i siRNA (Kim et al., 2004). Per la scoperta di questo nuovo meccanismo di regolazione genica i due giovani ricercatori Andrew Fire e Craig Mello nel 2006 hanno ricevuto il premio Nobel per la Fisiologia e la Medicina (Stevenson, 2004).

MicroRNAs: biogenesi e fisiologia

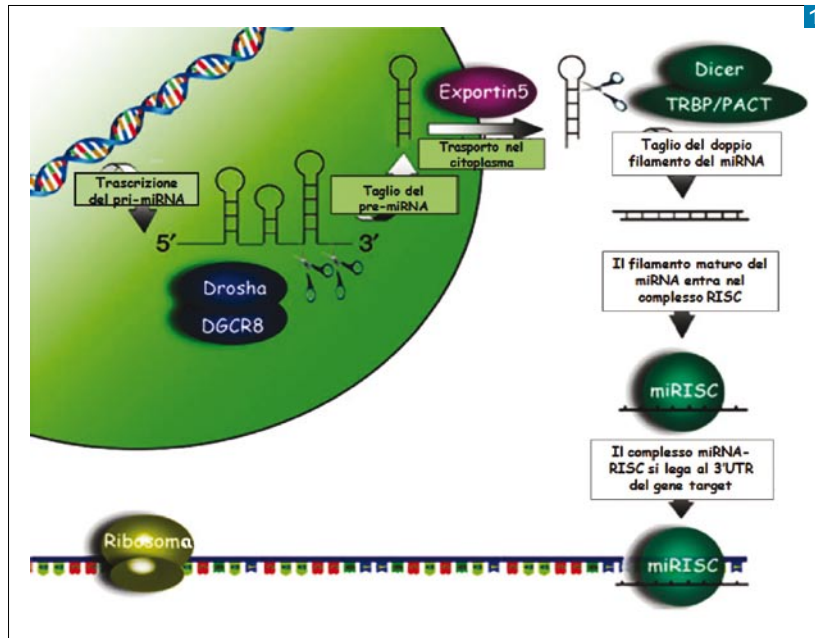
La produzione dei miRs è un meccanismo altamente regolato e complesso che richiede il lavoro di un gruppo di enzimi localizzati nel nucleo e nel citoplasma delle cellule. L'RNA polimerasi II trascrive i miRs in un grande precursore, detto pri-miR, con una struttura a forcina, un cap di 7-metil guanina al 5' e una coda di poliA al 3' (Fig. 1). Il pri-miR, di lunghezza variabile, è processato nel nucleo, da un complesso enzimatico definito "microprocessatore", in un pre-miR di circa 70 nucleotidi. Il complesso contiene l'enzima Drosha, un RNaseIII, un cofattore detto Pasha in *Drosophila melanogaster* e DGCR8 nell'uomo ed una proteina legante l'RNA a doppio filamento che permette il riconoscimento del substrato (Lee et al., 2002). Il pre-miR è trasportato nel citoplasma dall'exportin 5 (Exp5), un trasportatore cargo RAN-GTP dipendente (Lee et al., 2003; Lund et al., 2004). Nel citoplasma, la forcina del pre-miR diventa il substrato di un secondo enzima di tipo RNaseIII, detto Dicer, e ne deriva un frammento di circa 18-22 nucleotidi, a doppio filamento di RNA, detto miR:miR* duplex (Hutvagner et al., 2001). Il doppio filamento contenente il miR

Figura 1. Biogenesi dei miRNAs: dalla trascrizione del microRNA alla regolazione del gene target.

L'RNA polimerasi II trascrive il microRNA in un grande precursore, detto pri-miRNA, con una struttura a forcina. Il pri-miRNA è processato nel nucleo da un complesso enzimatico definito "microprocessatore" (Drosha-DGCR8), in un

pre-miRNA di circa 70 nucleotidi. Il pre-miRNA è trasportato nel citoplasma dall'exportin 5 (Exp5), un trasportatore cargo RAN-GTP dipendente. Nel citoplasma, la forcina del pre-miRNA diventa il substrato di un secondo enzima di tipo RNaselli, detto Dicer, e ne deriva un frammento di circa 18-22 nucleotidi, a doppio filamento di RNA. Il miR-

NA maturo è incorporato nel pre-miR associated multiprotein RNA-induced silencing complex (miRISC) che include la proteina Argonata. Il complesso miRISC con il miRNA si lega alla regione 3'UTR (non tradotta) del gene target e ne inibisce l'espressione o tramite la degradazione dell'mRNA target o tramite la repressione della traduzione.



maturo legato al suo complementare è incorporato nel *pre-miR associated multiprotein RNA-induced silencing complex* (RISC) che include la proteina Argonata (Fig. 1). Soltanto un singolo filamento resta nel complesso mentre l'altro è degradato da Argonata 2, una proteina del complesso RISC (Song et al., 2003). Le proteine appartenenti alla famiglia Argonata sono le endonucleasi che tagliano l'mRNA target. L'abilità di un miRs di legare e reprimere l'espressione del gene target è determinata per gran parte dall'energia libera di legame dei nucleotidi all'estremità 5' (2-8 nucleotidi) del miR, con un minore contributo della regione al 3'. Questa regione al 5' del microRNA è denominata "seed region"; la complementarietà di questa regione con la regione 3' non tradotta del gene target viene analizzata per la predizione computazionale dei

geni targets. Non è ancora chiaro il meccanismo di repressione operato dai miRs a livello traduzionale ma da recenti studi si evince che la repressione avviene a livello ribosomiale, tramite il legame di RISC al poliribosoma, formando un complesso stabile che impedisce la traduzione (Liu et al., 2005). È stato dimostrato, inoltre, che nel complesso RISC è presente la proteina inibitrice della traduzione eIF6. Quest'ultima media la repressione della traduzione operata dai microRNAs durante la fase di reclutamento dell'mRNA target. Il ruolo di eIF6, nell'inibizione dell'assemblamento delle subunità ribosomiali 60S e 40S e quindi nella prevenzione della formazione del complesso traduzionale, fa ipotizzare che possa cooperare con i microRNAs bloccando la fase iniziale della traduzione o il riciclo dei ribosomi. Il modello finale proposto è che il

complesso RISC utilizzi eIF6 per distruggere la formazione del poliribosoma (Thimmaiah et al., 2007).

MiRNAs e patologie

I miRs svolgono un ruolo cruciale nel controllo della crescita cellulare, del differenziamento e dell'apoptosi (Esquela-Kerscher et al., 2006) di conseguenza le alterazioni dell'espressione di questi piccoli RNA hanno un ruolo chiave nello sviluppo di varie patologie.

MiRNAs nelle patologie oncologiche

L'espressione di molti miRs è stata correlata con vari tumori umani ed è stato dimostrato che essi possono avere funzione oncogenica o oncosoppressoria. Circa il 50% dei miRs umani annotati infatti, sono localizzati in siti fragili del genoma associati al cancro ed inoltre, sono stati ritrovati differenzialmente espressi tra cellule tumorali e cellule normali (Tab. I). La prima evidenza del coinvolgimento di un miR nel cancro fu dimostrata nel lavoro di Calin et al., 2002, in cui venne studiata una delezione ricorrente del cromosoma 13q14 per scoprire il gene soppressore tumorale coinvolto nella patogenesi della leucemia linfatica cronica. In questo studio si scoprì che la piccola regione deleta in un dato sottogruppo di pazienti, codifica per due miRs: miR 15a e miR 16-1 (Tab. I). L'analisi di espressione di questi miRs in campioni leucemici ed in linfociti CD5⁺ normali ha evidenziato la diminuzione di espressione dei due miRs associata alla delezione

Tab. I. MicroRNAs correlati alle patologie oncologiche: sono indicati i nomi dei microRNAs la cui espressione è stata ritrovata alterata nei tumori e gli eventuali nomi dei geni *target* (se già identificati).

Tipo di tumore	Nome del microRNAs	Aumento/ Diminuzione di espressione	Gene target/ funzione biologica	Letteratura
Carcinoma del pancreas	MiR 100	+	NI	Volinia et al., 2006 Lee et al., 2007 Roldo et al., 2006
	MiR 103	+		
	MiRs 1-2	+		
	MiR 107	+		
	MiR 125b-1	+		
	MiR 155-bic	+		
Carcinoma papillare della tiroide	MiR 146b	+	Kit (miR 221-222/ crescita e differenziamento cellulare)	He et al., 2005 Pallante et al., 2006
	MiR 181b	+		
	MiR 221	+		
	MiR 222	+		
Adenoma ipofisario	Cluster miR 15-a/16-1	-	NI	Bottoni et al., 2005
Carcinoma prostatico	Let 7d	+	NI	Volinia et al., 2006
	MiR 128a	-		
	MiR 195	+		
	MiR 203	+		
Carcinoma dello stomaco	MiR 223	+	NI	Volinia et al., 2006
	MiR 21	+		
	MiR 218-2	-		
	MiR 103-2	+		
Tumori delle cellule germinali testicolari	MiR 372	+	LATS2	Voorhoeve et al., 2006
	MiR 373	+		
Tumori della mammella	miR 10b	-	AIB1(miR17-5p) miR 21/apoptosi	Volinia et al., 2006 lorio et al., 2005 Hossain et al., 2006
	MiR 21	+		
	MiR 29b-2	+		
	MiR 17- 5p	-		
	MiR 125b-1,2	-		
	MiR 145	-		
	MiR 146	+		
	MiR 155/BIC	+		
Linfomi maligni	Cluster miR 17-92	+	E2F1(miR17-5p e miR20a)/c-myc proliferazione cellulare E2F2/E2F3 (miR20a)/ proliferazione cellulare ed apoptosi	Woods et al., 2007 Eis et al., 2005 Calin et al., 2002, 2004 Cimmino et al., 2005
	MiR 155/BIC	+		

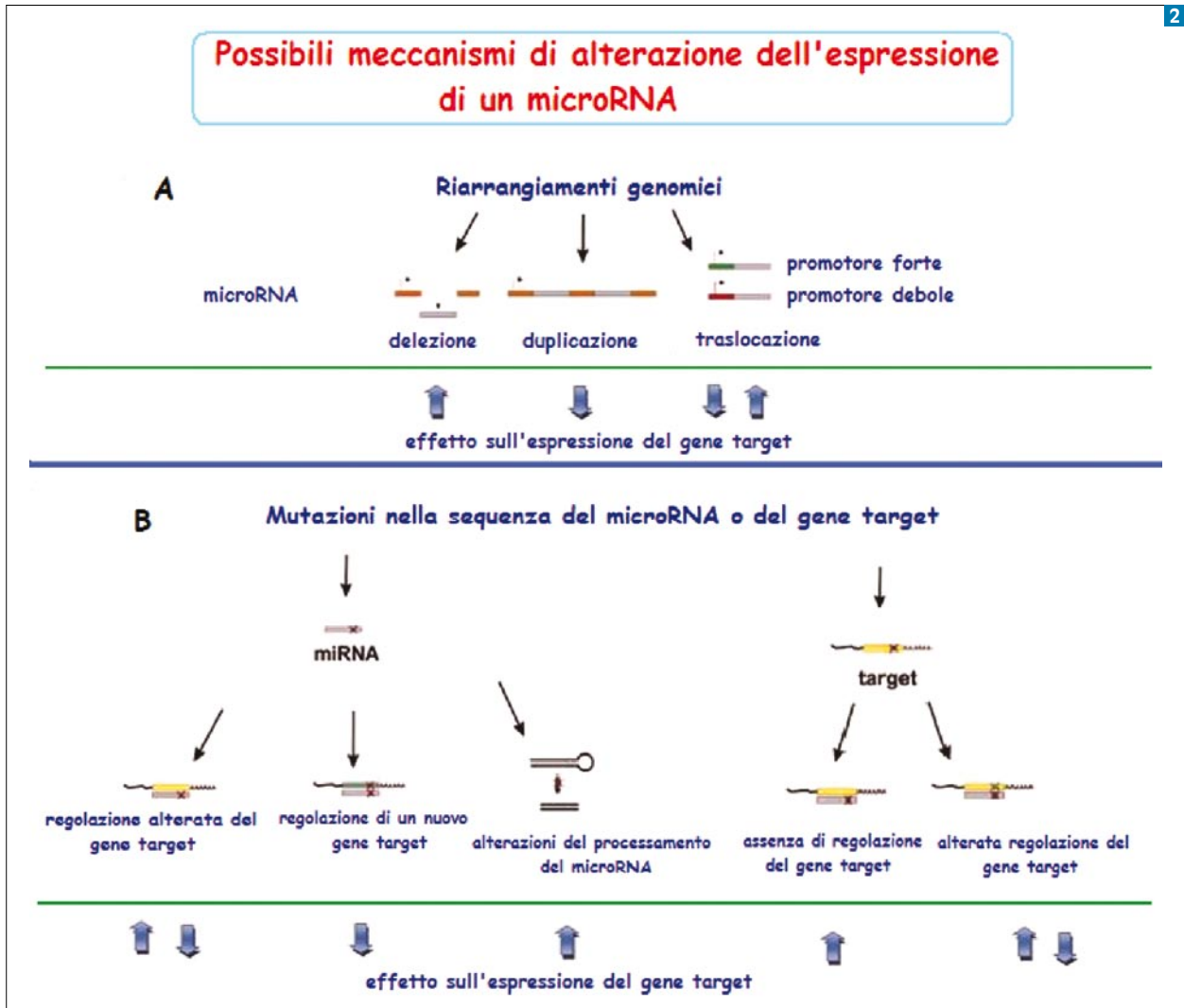
(continua)

(Tab. I segue)

Leucemia linfatica cronica a cellule B	Cluster miR 15-a/16-1	-	BCL2 (miR15a/16-1)/apoptosi	Eis et al., 2005 Calin et al., 2002, 2004 Cimmino et al., 2005
Cancro del colon-retto	Let-7	-	RAS (LET7a-1) TSP1 (cluster miR 17-92) CTGF (cluster miR 17-92)	Volinia et al., 2006
	miR10a	+		Calin et al., 2004, 2006
	Cluster 17-92	+		Slack et al., 2006
	MiR 20a	+		Hammond et al., 2006
	MiR 24-1	+		
	MiR 29b-2	+		
	MiR 31	+		
	MiR96	+		
	MiR 133b	-		
	MiR 135b	+		
	MiR 143	-		
	MiR 145	-		
MiR 185	+			
Carcinoma follicolare della tiroide	MiR 197	+	ACVR1, TSPAN3 (miR 197) EFEMP2 (miR 346)	Weber et al., 2006
	MiR 346	+		
Glioblastoma	MiR21	+	(miR 21)/apoptosi	Ciafre et al., 2005 Chan et al., 2005
	MiR 128	-		
	MiR 181 a-c	-		
	MiR 221	+		
Carcinoma epatico	MiR 18	+	NI	Murakami et al., 2006
	MiR 125a	-		
	MiR 195	-		
	MiR 199a	-		
	MiR 200a	-		
	MiR 224	+		
Neuroblastoma	MiR 34a	-	E2F3 (miR 34a)/apoptosi (miR 184)/apoptosi	Welch et al., 2007
	MiR184	-		
Carcinoma dei polmoni a grandi cellule	MiR Let 7	-	HRAS, KRAS, NRAS (famiglia let-7)/ Trasformazione oncogenica	Volinia et al., 2006 Takamizawa et al., 2004 Yanaihara et al., 2006 Johnson et al., 2005 Hayashita et al., 2005
	Cluster miR 17-92	+		
	MiR 21	+		
	MiR 155/BIC	+		
	MiR 200b	+		
	MiR 205	+		
MiR210	+			

Figura 2: Meccanismi di alterazione dell'espressione di un microRNA:
 A) il livello di espressione del microRNA può variare in seguito a riarrangiamenti genomici come delezioni o duplicazioni della regione genomica in cui è localizzato il microRNA, o traslocazioni che rilocalizzano il microRNA sotto il controllo di un nuovo promotore
 B) mutazioni nella sequenza del mi-

croRNA possono provocare 1. una regolazione alterata del gene target 2. possono causare il legame ad un nuovo gene target 3. possono causare alterazioni nella fase di produzione del microRNA; mutazioni nella regione di legame del microRNA nel 3'UTR del gene target possono provocare perdite o alterazioni nell'interazione con il target.



13q14 e quindi un possibile ruolo di geni oncosoppressori per tali miRs. Il putativo ruolo di oncosoppressori dei miR 15a e miR 16-1 è stato supportato dalla scoperta di mutazioni puntiformi nella linea germinale di due pazienti con leucemia linfatica cronica che provocano riduzione di espressione dei due miR maturi. Il dato è stato ulteriormente conferma-

to quando è stato scoperto che i due miRs regolano negativamente BCL2, un gene antiapoptotico la cui espressione è stata identificata in molti tipi di cancro. La delezione o la diminuzione di espressione dei due miRs provoca un aumento di espressione di BCL2 che promuove la proliferazione linfoide dei precursori ematopoietici (Cimmino et al., 2005).

L'attività di questi piccoli elementi regolatori può essere alterata anche da altri geni vicini alle regioni regolatorie del miR o dalla rilocalizzazione dello stesso miR in prossimità di altri elementi regolatori (Fig. 2). Il livello di espressione del microRNA può variare ad esempio in seguito a riarrangiamenti genomici come delezioni della regione genomica in

cui è localizzato il microRNA che conducono a perdita di tutto il miR e quindi ad una mancata regolazione del gene target; o duplicazioni che risultano in un aumento di espressione del miR maturo e diminuzione di espressione del gene target; o ancora traslocazioni che rilocalizzano il microRNA sotto il controllo di un nuovo promotore e quindi aumento o diminuzione di espressione oppure espressione in un nuovo tessuto. Inoltre, mutazioni nella sequenza del microRNA possono provocare una regolazione alterata del gene target, o il legame ad un nuovo gene target oppure alterazioni nella fase di produzione del microRNA; mutazioni nella regione di legame del microRNA nel 3'UTR del gene target possono provocare perdite o alterazioni nell'interazione con il target (Fig. 2). Gli effetti conclusivi possono essere un aumento dell'espressione del miR con conseguente diminuzione di espressione del gene target o diminuzione dell'espressione del miR con conseguente overespressione del target (Fig. 2). È stato dimostrato infatti, che il miR Let-7 è poco espresso nei tumori polmonari con conseguente aumento di espressione dell'oncogene RAS (Johnson et al., 2005). Due miRs appartenenti allo stesso cluster, miR 17-5p e miR 20a, regolano negativamente il fattore di trascrizione E2F1, un gene soppressore tumorale (O'Donnell et al., 2005).

MicroRNAs nelle patologie non oncologiche

I miRs sono coinvolti in un ampio spettro di malattie umane oltre a quelle oncologiche. La correlazione

tra miRs e malattie umane fu evidenziato per la prima volta dall'identificazione del complesso enzimatico definito "microprocessatore", in cui un cofattore essenziale è DGCR8, localizzato sul cromosoma 22 e frequentemente deletato nella sindrome di "Di George". Questa sindrome, clinicamente eterogenea, è una malattia congenita rara, in cui tra i sintomi più comuni si riscontrano infezioni ricorrenti, alterazioni cardiache e facies caratteristica.

Molti miRs sono stati ritrovati anche nei genomi virali di Epstein-Barr virus (EBV), simian virus 40 (SV40) e Kaposi sarcoma-associated virus (Gottwein et al., 2006). Il genoma di SV40 codifica per un miR che lega e degrada l'RNA messaggero codificante per gli antigeni T, anche se questo meccanismo non influenza direttamente la replicazione del virus rende tuttavia le cellule infettate dal virus meno sensibili all'azione delle cellule T, quindi indirettamente aumenta le sue capacità di sopravvivenza all'interno della cellula ospite (Sullivan et al., 2005).

Il ruolo dei miRs è stato studiato anche nella regolazione delle funzioni del sistema immunitario, in modo particolare il miR 155 è risultato fondamentale per la sua fisiologia. Il lavoro di Thai et al. (2007) ha dimostrato tramite la creazione di topi *knock-out* e *knock-in* per il miR, la sua funzione nella regolazione della risposta immunitaria dei centri germinali e la regolazione della differenziazione delle cellule T helper (TH). Il controllo di queste funzioni si esplica soprattutto tramite la regolazione della produzione delle citochine TNF- α e LT- α ; infatti, i topi con la delezione del miR hanno una produzione più che dimezzata delle due citochine. Inoltre, le cellule B

isolate dai centri germinali dei topi *knock-out* sono in quantità minore rispetto a quelle dei topi normali, invece quelle dei topi *knock-in* in quantità maggiore. Anche un saggio di immunoistochimica sulla milza isolata dai topi *knock-out* immunizzati mostra una diminuzione della grandezza dei centri germinali rispetto ai topi normali. Inoltre, il miR 155 è implicato nella differenziazione delle cellule T in cellule T helper TH1 e TH2; infatti i topi *knock-out* producono più IL-4 (interleuchina 4) e meno IFN- γ (interferone- γ) suggerendo che queste cellule T sono più prone alla differenziazione in cellule TH2 rispetto ai controlli normali (Thai et al., 2007). Un altro lavoro pubblicato nello stesso volume della rivista "Science" conferma i dati dell'articolo precedentemente citato. In più, tramite l'utilizzo di topi con una delezione del miR 155 hanno dimostrato che questi con il tempo sviluppano patologie polmonari con deposizione di collagene nelle vie aeree, aumento della massa delle cellule muscolari lisce e aumento di linfociti, macrofagi ed eosinofili. Inoltre, tali topi presentano un'immunità adattativa assente; infatti, anche dopo la vaccinazione contro *Salmonella typhimurium* non resistono alla somministrazione orale di questo batterio a causa di una deficiente attività dei linfociti B e T e muoiono entro 33 giorni dalla somministrazione del batterio. In questo lavoro, a differenza del precedente, gli Autori studiano anche i possibili *targets* di questo miR; infatti tramite un'analisi mediante *microarray* individuano quasi cento possibili *targets* del miR, tutti geni implicati nelle funzioni del sistema immunitario. Per di più, dimostrano il reale legame del miR 155 ad uno dei suoi

possibili *target*: il fattore di trascrizione c-Maf. Quest'ultimo è un potente trans-attivatore del promotore dell'IL-4 (Rodriguez et al., 2007).

La funzione dei miRs è stata studiata anche nelle patologie cardiache, vari lavori pubblicati recentemente hanno evidenziato il ruolo cruciale dei miRs nella regolazione dell'espressione genica del miocardio. La delezione dei miR 1-2 è stata associata alla deregolazione della cardiogenesi, alterazione dei parametri elettrocardiografici ed iperplasia dei cardiomiociti mediante studi in vivo su topi *knock-out* (Zhao et al., 2007). I due miRs, derivanti dallo stesso trascritto, legano ed inibiscono la funzione del fattore trascrizionale Irx5. Quest'ultimo appartiene alla famiglia di fattori trascrizionali Iroquois, contenenti omeodomini, e regola la ripolarizzazione dei cardiomiociti tramite la repressione del canale del potassio Kcnd2. Inoltre, nello stesso lavoro è stato dimostrato che la biogenesi dei miRs è essenziale per la cardiogenesi durante la vita embrionale; infatti, i topi con una delezione selettiva del gene Dicer (enzima cruciale per la maturazione dei miRs) nel cuore muoiono durante la vita embrionale per difetti morfologici del muscolo cardiaco.

Altri microRNA sono stati studiati per il loro coinvolgimento in patologie cardiache come il microRNA 133 ed il microRNA 1. Essi appartengono alla stessa unità trascrizionale e sono selettivamente espressi nel muscolo scheletrico e nei miociti cardiaci sia umani che murini. Entrambi svolgono un ruolo chiave nella proliferazione e nel differenziamento dei mioblasti. I livelli di espressione del microRNA 133 sono stati ritrovati diminuiti sia nei tessuti ipertrofici cardiaci umani che murini

(Care et al., 2007). Mediante studi in vivo su modelli murini di ipertrofia cardiaca, gli Autori hanno dimostrato che il microRNA blocca l'ipertrofia dei cardiomiociti. Nello stesso lavoro, nei topi è stato somministrato un oligoribonucleotide antisense al miR 133 (antagomir) per via sottocutanea tramite una minipompa impiantata nella cute. L'antagomir silenzia in maniera specifica l'espressione del miR che diminuisce del 70% rispetto ai controlli. Dopo un mese di somministrazione dell'antagomir, i topi mostrano una marcata ipertrofia dei cardiomiociti rispetto ai controlli. Il dato è stato confermato in un altro esperimento in cui in un topo *knock-out* per il miR133 è stato somministrato per via intracoronarica un vettore adenovirale codificante per il miR 133. L'overespressione del miR causa una significativa riduzione della grandezza dei miociti nel ventricolo sinistro. Inoltre, in questo lavoro, sono stati validati 3 geni *targets* del microRNA: RhoA e Cdc42, piccole proteine leganti il GTP, coinvolte nei riarrangiamenti citoscheletrici e miofibrillari durante lo sviluppo dell'ipertrofia cardiaca; NELF-A/Whsc2 un regolatore negativo dell'RNA polimerasi II, frequentemente alterato nella sindrome di Wolf-Hirschhorn caratterizzata da disgenesia cardiaca. Questo lavoro è molto importante per le implicazioni cliniche, infatti la modulazione dell'espressione del miR133 tramite la somministrazione di antagomirs potrebbe avere future applicazioni nella terapia clinica.

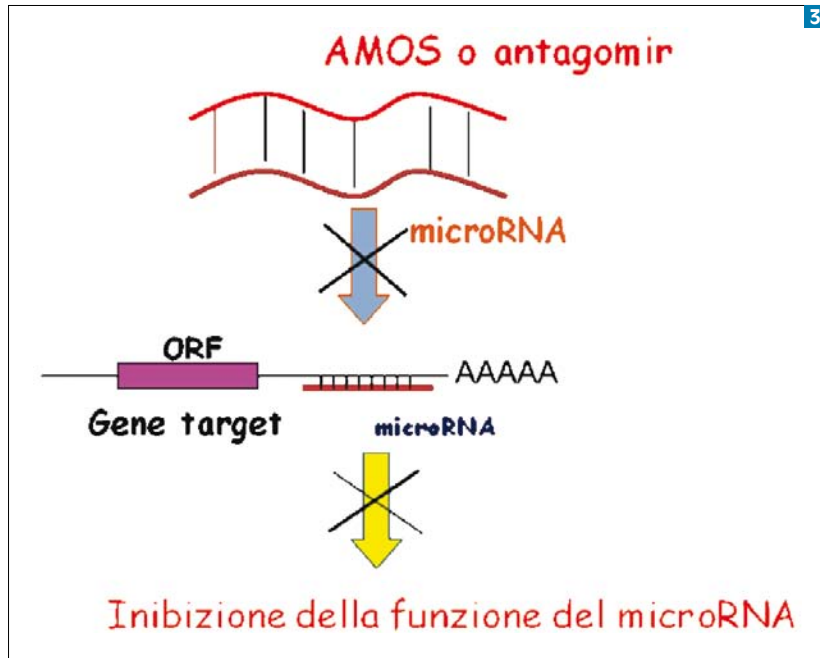
Nuovi recenti sviluppi nella correlazione tra miRs e patologie stanno emergendo dallo studio dei polimorfismi di singoli nucleotidi (SNP) presenti nelle sequenze dei miRs e nelle regioni 3' non tradotte dei

geni *targets*. Gottwein et al. (2006) dimostrarono per la prima volta che un polimorfismo nel precursore del miR K5 nel virus KSHV riduceva il processamento del miR operato dall'enzima Drosha, con diminuzione di espressione della forma matura e conseguente assenza di funzione del miR. Un polimorfismo di singolo nucleotide nella regione 3' non tradotta del gene SLITRK1 (Slit- and Trk-like 1) è stato associato alla sindrome di Tourette, una patologia neuropsichiatrica genetica. In alcuni pazienti è stata ritrovata la sostituzione guanina in adenina nella regione 3' non tradotta del gene SLITRK1 frequentemente mutato in questa sindrome. Questa sostituzione stabilizza il legame tra il miR 189 ed il sito di legame nel gene SLITRK1 di cui è ridotta la traduzione rispetto agli individui normali (Niwa et al., 2007). Un altro esempio interessante è il caso della pecora Texel che sviluppa una muscolatura molto forte a causa della perdita di funzione del gene della miostatina (GDF8). Nella regione codificante di questo gene però non furono trovate mutazioni, invece nella regione 3' non tradotta fu trovata una sostituzione guanina in adenina che determina la formazione di siti di legame per i miR 1 e 206. Il legame dei due miRs diminuisce l'espressione del gene GDF8 che determina il fenotipo muscolare nelle pecore Texel (Niwa et al., 2007).

MiRNAs e terapia

Il rapido sviluppo delle conoscenze dei meccanismi di regolazione dei miRs suggerisce che essi possano diventare dei bersagli terapeutici oppure possano essi stessi diventare farmaci per un largo spettro di pato-

Figura 3: Meccanismo di azione degli antagomirs: gli antagomirs, oligonucleotidi ad RNA complementari alla sequenza del microRNA si legano ad essi impedendone il legame alla regione 3' non tradotta del gene target, inibendone quindi la funzione.



logie. Infatti, un concetto rilevante in ambito terapeutico è che un microRNA può regolare l'espressione di più proteine *target*, interagendo con più mRNA *target*. L'utilizzo dei miRs potrebbe essere una nuova modalità di "terapia epigenetica" e potrebbe essere applicata a patologie multigeniche causate dall'alterata regolazione dei miRs.

L'interazione tra miR e mRNA *target* è essenziale per la funzione del miR, per tale motivo un nuovo approccio utilizzato in vari studi, *in vitro*, è la sintesi di oligonucleotidi anti-senso sintetici che codificano per sequenze complementari al miR maturo, detti anti-miRNA oncogenici (AMOS) o antagomirs (Fig. 3). Questi oligo, tramite una sequenza antisense, si legano in maniera complementare al miRNA e ne inattivano la funzione impedendo il successivo legame del miR alla regione 3' non tradotta

del gene *target* (Fig. 3) (Kruzfeldt et al., 2005). L'inattivazione dei miRNAs è stata ancora migliorata dall'uso di oligoribonucleotidi 2'ossi-metil, più stabili rispetto agli oligonucleotidi tradizionali perché la modificazione del ribosio rende l'RNA resistente alle nucleasi cellulari. Stoffel et al. (2005) hanno ottenuto l'inibizione, *in vivo*, di miRs tramite RNA antisense modificati. Le modificazioni dell'oligoribonucleotide sono state di tre tipi: lo scheletro dell'RNA è stato modificato in ogni nucleotide nella posizione 2' del ribosio; i nucleotidi terminali di entrambe le estremità sono stati modificati con un legame fosforotioato al posto di uno fosfodiesterico, queste due modificazioni aumentano la resistenza alle nucleasi presenti nelle cellule e nel siero. La terza modificazione è stata l'inserimento di una molecola di colesterolo al terminale

3'. Questa modificazione migliora le proprietà farmacocinetiche aumentando il legame alle proteine del siero con conseguente aumento della stabilità e dell'emivita plasmatica ed inoltre ne facilita l'entrata nella cellula. Questi antagomirs così modificati sono stati somministrati per via endovenosa nei topi (attraverso la vena della coda) e hanno bloccato l'espressione dei miRs complementari. L'inibizione era presente in tutti i tessuti tranne che nel cervello per la riduzione della diffusione degli acidi nucleici attraverso la barriera ematoencefalica (Kruzfeldt et al., 2007; Czech, 2006). La completa deplezione dei miRNAs è stata ottenuta tramite la somministrazione di 240 mg di antagomirs per chilogrammo di peso corporeo, l'effetto di inibizione del miRNA è durato per 23 giorni dopo la somministrazione.

Inoltre, sono stati sintetizzati nucleotidi LNA (*locked nucleic acid*) spesso definiti RNA inaccessibili o ribonucleotidi modificati, in cui l'anello del ribosio contiene un ponte extra che connette i carboni 2' e 4'. Il ponte aumenta la stabilità della struttura in seguito ad un aumento della temperatura di legame.

Nel caso in cui il miR funzioni da oncosoppressore e sia poco espresso nella condizione patologica l'obiettivo è aumentarne l'espressione tramite sistemi di veicolazione che utilizzino vettori virali o liposomi per introdurre il miR nella cellula. Questa tecnica prevede l'espressione del pre-miR sotto il controllo di un promotore specifico per stimolare il meccanismo endogeno al fine di processare il miR e reprimere l'espressione del gene *target* (Gleave et al., 2005). Un approccio molto efficiente è stato quello di far produrre il microRNA da un vettore di espres-

sione sotto il controllo del promotore per la polimerasi III come H1 e U6 o da vettori contenenti promotori per la polimerasi II come il promotore CMV (citomegalovirus) molto forti. L'espressione del microRNA è stata migliorata dall'introduzione nel vettore del pri-microRNA cioè delle regioni fiancheggianti il miR maturo compreso la struttura a forcina. In questo modo nella cellula si riproduce il meccanismo fisiologico di biogenesi del miR migliorandone l'efficienza di espressione (Chung et al., 2006). Inoltre, più microRNAs possono essere espressi da un singolo trascritto policistronico per aumentare l'espressione di differenti miRs contemporaneamente. Sono stati sviluppati, infatti, software che permettono di disegnare miRs artificiali che legano ed inibiscono differenti *targets* contemporaneamente, permettendo una regolazione contemporanea di molti mRNA. Il problema dell'utilizzo di vettori per introdurre i miRNAs nella cellula sta nel pericolo dell'integrazione nel genoma e nella possibile risposta del sistema immunitario del paziente, infatti, l'interferone che partecipa alla risposta immunitaria contro le infezioni virali, è attivato dalla presenza di doppi filamenti di RNA. Non ci sono però evidenze che questa risposta influenzi il grado o la specificità del silenziamento genico. Inoltre, un dato molto incoraggiante è che l'introduzione del pre-miRNA o del pri-miRNA nella cellula non attiva la risposta dell'interferone.

Nel caso, invece, che la patologia sia causata da mutazioni del miR, si può inibire l'espressione del miR mutato mediante l'uso di oligoribonucleotidi antisenso, o se sono presenti mutazioni della regione 3'UTR di legame del miR con il gene target si può

interferire mediante l'inibizione dell'mRNA maturo con il meccanismo dell'RNA interference (Wurdinger et al., 2006). Il meccanismo dell'RNA interference è infatti utilizzato in molti laboratori di ricerca per inibire l'espressione di uno specifico mRNA. Gli approcci più utilizzati sono quelli nel campo dell'oncologia per inibire geni coinvolti nel processo oncogenetico e per il trattamento delle malattie infettive. Nell'ultimo caso le strategie più interessanti sono quelle che utilizzano il meccanismo dell'RNA interference non solo contro l'RNA del patogeno ma anche contro l'RNA di cofattori cellulari da cui dipende l'infezione. Molti studi hanno dimostrato che l'RNAi può inibire direttamente i trascritti virali o nel caso di virus a RNA direttamente il genoma virale. Tramite questo meccanismo sono state inibite le infezioni dei virus dell'HIV, dell'epatite B e C e del poliovirus in linee cellulari con ottimi risultati. Nel caso dell'infezione da HIV è promettente l'utilizzo dell'RNAi per bloccare l'espressione del recettore CCR5 implicato in questa infezione, infatti gli individui omozigoti per la delezione di 32 basi in questo gene sono resistenti all'infezione da HIV (Stevenson, 2004; Kim et al., 2004). Nel caso dell'infezione del virus dell'epatite B (HBV), uno studio condotto su modelli murini ha dimostrato che la somministrazione di un vettore adenovirale (che non si integra nel genoma) codificante per un siRNA anti HBV ha inibito l'infezione per un periodo maggiore di cinque mesi dimostrando che il meccanismo dell'RNA interference è stabile ed efficace contro le infezioni virali (Kim et al., 2004).

La continua identificazione di miRNAs coinvolti nello sviluppo di pa-

tologie fa ipotizzare che essi possano essere utilizzati anche come *marker* prognostici di patologie. Molti gruppi di ricerca sono impegnati nello studio di profili di espressione di miRNAs di diversi tessuti umani paragonati ai rispettivi tumori per classificare i tumori ed usare i miRNAs come *markers* di prognosi. Diverse case farmaceutiche, inoltre, stanno sviluppando nuove tecniche per identificare i miRNAs direttamente dal sangue o da altri liquidi biologici e non da biopsie tissutali per evitare tali prelievi non sempre ben accettati dal paziente per l'invasività (Esquela-Kerscher et al., 2006; Mack, 2007).

Le potenzialità della terapia con antagomirs sono formidabili ma occorreranno ancora molti anni di studio per migliorare la stabilità, la potenza e la specificità di tessuto di questi futuri agenti terapeutici.

Il completamento del progetto "Genoma Umano" ha permesso di stabilire che il numero di geni è relativamente piccolo rispetto a quello delle proteine. Circa il 5% del genoma codifica per polimorfismi di singolo nucleotide e la maggior parte delle sequenze cosiddette "spazzatura" esplica invece una funzione. L'identificazione dei microRNAs apre la strada a riconsiderare il ruolo del DNA intronico nel genoma umano, nel quale sono stati identificati geni non tradotti "piccoli-RNAs" che sono di notevole importanza visto il loro ruolo di fine regolazione di altri mRNA *targets*. I microRNAs sono oggi oggetto di studio sia in ricerca di base per comprendere in modo dettagliato il loro meccanismo di azione sia in ricerca traslazionale per utilizzare queste conoscenze in future applicazioni nella terapia clinica.

Glossario

MicroRNA Lin-4: è stato il primo microRNA scoperto in *C. Elegans*, il nome deriva dal gene Lin-4 in cui è localizzato, in seguito alla scoperta di molti microRNA si è passati alla nomenclatura attuale con un numero identificativo per ogni miRNA.

MicroRNA Let-7: è stato il secondo microRNA scoperto in *C. Elegans*, il nome deriva dal gene LET-7 in cui è localizzato.

Knock-out: termine che identifica l'eliminazione di un gene in cellule o animali modello.

Knock-in: termine che identifica l'inserimento di un gene in cellule o animali modello.

Microarray o chip a DNA: tecnica che permette di identificare il profilo di espressione di più geni contemporaneamente. Un *chip* è generalmente costituito da una collezione di oligonucleotidi di DNA legati in maniera

covalente ad una matrice. La tecnica si basa sull'ibridazione DNA-DNA o RNA-DNA in condizioni stringenti. **Omeodominio:** motivo strutturale presente in alcuni fattori trascrizionali, formato da due alfa eliche separate da un foglietto beta. Un'elica serve per il riconoscimento della sequenza specifica sul DNA del gene da regolare, l'altra elica ed il foglietto beta facilitano il processo di riconoscimento del gene.

Vettore adenovirale: vettore per il trasferimento di materiale genetico derivato dagli adenovirus utilizzato in terapia genica. È utilizzato per esprimere geni o miRNAs in strategie terapeutiche contro il cancro o qualsiasi altra patologia. Non integra nel genoma e trasduce sia cellule in attiva divisione che cellule quiescenti.

Trascritto policistronico: singolo RNA può generare più prodotti cioè più messaggeri. Per i miRNAs un

singolo trascritto policistronico può contenere diverse strutture a forcina codificanti per miRNAs.

RNA target: RNA messaggero che è legato da un miRNA o da un siRNA.

Sito fragile: sito nel cromosoma che è suscettibile a rotture, amplificazioni e fusioni con altri cromosomi. Questi processi possono essere provocati da esposizioni ad inibitori della replicazione del DNA, esistono più di 80 siti fragili descritti in letteratura.

Centri germinali: siti presenti nei tessuti linfoidi in cui viene maturata l'affinità degli anticorpi e vengono generate le cellule B della memoria in risposta agli antigeni T-dipendenti. **NELF-A/Whsc2:** subunità del fattore negativo di elongazione NELF, agisce sull'RNA polimerasi II causando arresto della trascrizione. In recenti studi la sua espressione è stata associata alla cardiogenesi.

Box riassuntivo

Cosa si sapeva prima

La regolazione genica della trascrizione è operata dai fattori di trascrizione, proteine che attivano o reprimono la trascrizione di altri geni legando piccoli elementi regolatori detti siti di legame per fattori trascrizionali.

Cosa si sa adesso

I microRNAs piccole molecole di RNA, di circa 22 nucleotidi, a singolo filamento reprimono l'espressione dei geni targets a livello post-trascrizionale. Essi legano sequenze parzialmente complementari nella regione 3' non tradotta del gene *target*.

... e per la pratica clinica

I microRNAs possono diventare dei bersagli terapeutici oppure possono essere utilizzati come farmaci per un largo spettro di patologie. In recenti approcci, *in vivo*, nei topi la somministrazione di oligoribonucleotidi modificati, complementari alla sequenza dei microRNAs (antagomir) ha inibito l'espressione del microRNA con promettenti risvolti terapeutici. Inoltre, in futuro potranno essere utilizzati anche come *markers* prognostici di patologie.

Bibliografia

- Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohammed A, et al. *RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications*. Microbiol Molecular Biol Rev 2003;67:657-85.
- Bagga S, Bracht J, Hunter S, et al. *Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation*. Cell 2005;122:553-63.
- Bartel DP. *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell 2004;116:281-97.
- Bottoni A, Piccin D, Tagliati F, et al. *miR-15a and miR-16-1 down-regulation in pituitary adenomas*. J Cell Physiol 2005;204:280-5.
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. *Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:15524-9.
- Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M. *MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias*. Proc Natl Acad Sci USA 2004;101:11755-60.
- Care A, Catalucci D, Felicetti F, et al. *MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy*. Nat Med 2007;13:613-8.
- Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. *MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells*. Cancer Res 2005;65:6029-33.
- Chung KH, Hart CC, Al-Bassam S, et al. *Polycistronic RNA polymerase II expression vectors for RNA interference based on BIC/miR-155*. Nucleic Acids Res 2006;34:e53.
- Ciafre SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M. *Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma*. Biochem Biophys Res Commun 2005;334:1351-8.
- Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. *miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2*. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:13944-9.
- Czech MP. *MicroRNAs as Therapeutic Targets*. N Engl J Med 2006;354:11.
- Di Leva G, Calin GA, Croce CM. *MicroRNAs: Fundamental Facts and Involvement in Human Diseases*. Birth Defects Res (Part C) 2006;78:180-9.
- Eis PS, Tam W, Sun L, Chadburn A. *Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas*. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:3627-32.
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ. *Oncomirs - microRNAs with a role in cancer*. Nat Rev Cancer 2006;6:259-69.
- Gleave ME, Monia BP. *Antisense therapy for cancer*. Nat Rev Cancer 2005;5:468-79.
- Gottwein E, Cai X, Cullen BR. *Expression and function of microRNAs encoded by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 2006;71:357-64.
- Hammond SM. *MicroRNA therapeutics: a new niche for antisense nucleic acids*. Trends Mol Med 2006;12:99-101.
- Harfe BD. *MicroRNAs in vertebrate development*. Curr Opin Genet Dev 2005;15:410-5.
- Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. *A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA*. Science 2001;293:834-8.
- Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H. *A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation*. Cancer Res 2005;65:9628-32.
- He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachi S. *The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma*. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:19075-80.
- Hossain A, Kuo MT, Saunders GF. *Mir-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of AIB1 mRNA*. Mol Cell Biol 2006;26:8191-201.
- Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, et al. *A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA*. Science 2001;293:5531.
- Hwang HW, Mendell JT. *MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis*. Br J Cancer 2006;94:776-80.
- Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. *MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer*. Cancer Res 2005;65:7065-70.
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al. *RAS is regulated by the let-7 microRNA family*. Cell 2005;120:635-47.
- Kim DH, Rossi JJ. *Strategies for silencing human disease using RNA interference*. Nat Rev Gen 2007;8.
- Krutzfeldt J, Kuwajima S, Braich R, et al. *Specificity, duplex degradation and subcellular localization of antagomirs*. Nucleic Acids Res 2007;35:2885-92.
- Lee Y, Ahn C, Han J, et al. *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. Nature 2003;425:415-9.
- Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. *MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization*. Emb J 2002;21:4663-70.
- Lee EJ, Gusev Y, Jiang J. *Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer*. Int J Cancer 2007;120:1046-54.
- Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R. *MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies*. Nat Cell Biol 2005;7:719-23.
- Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. *Nuclear export of microRNA precursors*. Science 2004;303:95-8.
- Mack GS. *MicroRNA gets down to business*. Nat Biotechnol 2007;25.
- Maroney PA, Yu Y, Fisher J, Nilsen TW. *Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells*. Nat Struct Mol Biol 2006;13:1102-7.
- Miska EA. *How microRNAs control cell division, differentiation and death*. Curr Opin Genet Dev 2005;15:563-8.
- Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T. *Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues*. Oncogene 2006;25:2537-45.
- Niwa R, Slack FJ, Ryusuke N, Slack FJ. *The evolution of animal microRNA function*. Curr Opin Gen Develop 2007;17:145-50.
- Nottrott S, Simard MJ, Richter JD. *Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes*. Nat Struct Mol Biol 2006;13:1108-14.
- Nuovo G, Lim LP, Lau NC, et al. *Microarray analysis shows that some microRNAs down-regulate large numbers of target mRNAs*. Nature 2005;433:769-73.
- O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. *c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression*. Nature 2005;435:839-43.
- Olsen PH, Ambros V. *The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in Caenorhabditis elegans by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation*. Dev Biol 1999;216:671-80.
- Pallante P, Visone R, Ferracin M, et al. *MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas*. Endocr Relat Cancer 2006;13:497-508.
- Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, et al. *Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function*. Science 2007;316:608-11.
- Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, Falconi M. *MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior*. J Clin Oncol 2006;24:4677-84.
- Slack FJ, Weidhaas JB. *MicroRNAs as a potential magic bullet in cancer*. Future Oncol 2006;2:73-82.
- Song JJ, Liu J, Tolia NH, et al. *The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes*. Nat Struct Biol 2003;10:1026-32.

- Stevenson M. *Therapeutic Potential of RNA Interference*. N Engl J Med 2004;351:1772-7.
- Sullivan CS, Grundhoff AT, Tevethia S, Pipas JM, Ganem D. *SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells*. Nature 2005;435:682-6.
- Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S. *Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival*. Cancer Res 2004;64:3753-6.
- Thai TH, Calado DP, Casola S, et al. *Regulation of the germinal center response by microRNA-155*. Science 2007;316:604-8.
- Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. *A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets*. Proc Natl Acad Sci USA 2006;103:2257-61.
- Voorhoeve PM, Le Sage C, Schrier M, et al. *A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors*. Cell 2006;124:1169-81.
- Weber F, Teresi RE, Broelsch CE, Frilling A, Eng C. *A limited set of human MicroRNA is deregulated in follicular thyroid carcinoma*. J Clin Endocrinol Metab 2006;91:3584-91.
- Welch C, Chen Y, Stallings RL. *MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells*. Oncogene 2007.
- Woods K, Thomson JM, Hammond SM. *Direct regulation of an oncogenic micro-RNA cluster by E2F transcription factors*. J Biol Chem 2007;282:2130-4.
- Wurdinger T, Costa FF. *Molecular therapy in the microRNA era*. Pharmacogenomics J 2006;26.
- Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M. *Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis*. Cancer Cell 2006;9:189-98.
- Zhao Y, Ransom JF, Li A, et al. *Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2*. Cell 2007;129:303-17.

Ringraziamenti

Si ringrazia la Fondazione Italiana per la Lotta al Neuroblastoma.

Corrispondenza

Manca

