



# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI UDINE**

---

Corso di Dottorato di Ricerca in Scienze e Tecnologie Cliniche  
Ciclo XXVIII

**Tesi di Dottorato di Ricerca**

## **ESPRESSIONE ED EFFETTI DELLA RNA BINDING PROTEIN HUR NELLE NEOPLASIE TIROIDEE**

Dottoranda:

Dott.ssa Federica Baldan

Tutor:

Prof. Giuseppe Damante

Coordinatore:

Prof. Giuseppe Damante

---

Anno Accademico 2015-2016

# SOMMARIO

SINOSSI.....	1
INTRODUZIONE .....	3
RNA binding proteins.....	3
La struttura delle RNA binding proteins .....	4
Le funzioni delle RNA binding proteins.....	5
Gli AU-rich elements .....	8
Le famiglie di RNA binding protein .....	9
RNA binding protein e cancro.....	11
HuR.....	15
Il gene e la regolazione dell'espressione dell'mRNA di HuR.....	16
La proteina .....	19
HuR e cancro.....	25
La tiroide .....	29
Fisiologia della ghiandola tiroide .....	32
I tumori tiroidei.....	35
I tipi di tumori tiroidei.....	35
La genetica dei tumori tiroidei.....	39
La diagnosi .....	43
Prognosi e terapia .....	47
SCOPO DELLA TESI .....	51
MATERIALI E METODI .....	52
Tessuti umani e colture cellulari .....	52

Immunohistochimica .....	52
Preparazione di estratti proteici .....	53
Western Blot .....	54
Trasfezione cellulare e silenziamento di HuR .....	55
Annessina V assay .....	56
Sequenziamento .....	57
Retrotrascrizione.....	59
Real Time PCR .....	59
RBP Immunoprecipitation (RIP) .....	61
Elettroforesi bidimensionale.....	64
Analisi Statistiche .....	66
RISULTATI.....	67
Espressione di HuR in tiroide .....	67
Espressione tiroide di HuR <i>in vivo</i> .....	67
Espressione di HuR <i>in vitro</i> .....	68
Localizzazione di HuR <i>in vitro</i> .....	69
Effetti del silenziamento di HuR .....	70
Silenziamento della proteina HuR .....	70
Effetti del silenziamento di HuR sulla vitalità cellulare.....	71
Effetti molecolari del silenziamento di HuR.....	73
Analisi dei profili di legame di HuR .....	81
Analisi modificazioni post-traduzionali di HuR .....	85
DISCUSSIONE.....	86

BIBLIOGRAFIA.....	92
PUBBLICAZIONI OTTENUTE DURANTE IL DOTTORATO .....	101

## SINOSI

La regolazione dell'espressione genica è un processo essenziale attraverso il quale le cellule reagiscono ai cambiamenti che avvengono nel loro microambiente. Un meccanismo chiave della regolazione dell'espressione genica avviene a livello post-trascrizionale, ovvero sull'RNA, la cui regolazione permette alle cellule di rispondere agli stimoli ambientali in maniera più rapida rispetto alla produzione di trascritti *de novo*.

Dopo la trascrizione, il destino dell'RNA è controllato dalle RNA-binding proteins (RBPs), le quali sono in grado di regolare tutte le fasi della biogenesi dell'RNA, incluso lo *splicing*, la poliadenilazione, il trasporto nucleo-citoplasmatico, la localizzazione, la traduzione e la degradazione. Poiché le RBPs sono essenziali per i processi cellulari, la loro alterazione, in termini di espressione, attività e interazione con i target, può portare ad una regolazione aberrante dell'espressione genica, con il conseguente sviluppo di patologie tra le quali il cancro.

In questa tesi mi sono concentrata su HuR, una RNA-binding protein (RBP) molto studiata in letteratura per il suo ruolo nello sviluppo tumorale di diverse neoplasie. È noto, infatti, che l'over-espressione di HuR nelle cellule neoplastiche caratterizza diversi tipi di tumore. Non esistono, però, dati riguardanti HuR e la sua espressione nei carcinomi tiroidei. Questo studio si è, quindi, posto l'obiettivo di analizzare l'espressione e la funzione di questa RBP nella tumorigenesi tiroidea. In un primo setting sperimentale abbiamo valutato l'espressione di HuR, sia *in vivo* che *in vitro* e abbiamo determinato come questa sia over-espressa anche nelle neoplasie tiroidee. In seguito, focalizzandoci su una linea tiroidea non tumorigenica (Nthy-ori-3.1) e su una tumorigenica (BCPAP), abbiamo valutato gli effetti del silenziamento di HuR, sia a livello della vitalità cellulare, sia dell'espressione genica. Abbiamo quindi dimostrato come il silenziamento di HuR induca una riduzione della vitalità cellulare e un aumento dei processi apoptotici in entrambe le linee cellulari. Inoltre, attraverso un'analisi di RNA-seq, abbiamo messo in luce la presenza

di diversi profili di espressione genica in risposta al silenziamento di HuR nelle linee cellulari Nthy-ori-3.1 e BCPAP.

Al fine di valutare se questi diversi effetti del silenziamento di HuR fossero dovuti alla presenza di profili di legame diversi nelle due linee, abbiamo eseguito una HuR RIP-seq, attraverso la quale è stato possibile valutare come questa RNA Binding Protein legghi mRNA diversi in cellule diverse.

Lo studio è quindi proseguito indagando se le cause di questo diverso comportamento di HuR nelle due linee cellulari fossero imputabili a diverse modifiche post-trasduzionali a carico della RBP, attraverso un'analisi elettroforetica bidimensionale.

I dati ottenuti in questo studio dimostrano che i target delle RBP possono essere diversi anche in cellule con la stessa origine tissutale, ma con diverso grado di aggressività. Questi risultati potrebbero fornire importanti informazioni per capire l'origine delle alterazioni molecolari presenti nelle cellule tumorali.

# INTRODUZIONE

## RNA binding proteins

La regolazione dell'espressione genica è un processo essenziale attraverso il quale le cellule rispondono ai cambiamenti che avvengono nel loro microambiente. In particolare la regolazione dell'espressione genica può indurre l'attivazione o la repressione di particolari prodotti genici. In questo modo le cellule possono adattare i loro profili di espressione genica e "riprogrammarsi" in risposta a stimoli differenti.

Benché negli ultimi decenni la regolazione dell'espressione genica sia stata studiata primariamente a livello trascrizionale (Dyan e Tjian, 1985; Ptashne, 2005), è ormai chiaro che uno dei principali meccanismi di regolazione dell'espressione genica avvenga a livello post-trascrizionale, ovvero a livello dell'RNA. La regolazione dell'RNA, infatti, permette alle cellule di rispondere agli stimoli ambientali in maniera molto più veloce rispetto alla produzione di trascritti *de novo*. Infatti molti eventi dello sviluppo cellulare, come proliferazione, differenziamento, apoptosi, vengono regolati da meccanismi post-trascrizionali che controllano la maturazione, le modifiche, la stabilità, la localizzazione e la traduzione dell'mRNA (Siomi, et al., 1997).

La regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica può, inoltre, generare un enorme range di prodotti proteici a partire da un singolo gene: a livello nucleare, ad esempio, ci sono molteplici meccanismi che permettono di generare RNA diversi da un singolo gene (*splicing* alternativo del pre-mRNA, poliadenilazione su siti alternativi, editing dell'RNA); mentre nel citoplasma l'uso di siti alternativi d'inizio della traduzione permette la produzione di proteine funzionalmente differenti da un singolo mRNA (Siomi, et al., 1997). Inoltre, un ulteriore controllo dell'espressione genica a livello citoplasmatico è dato dalla regolazione della stabilità e della traduzione dell'mRNA attraverso meccanismi di *RNA interference* (ad esempio siRNA e microRNA) e attraverso l'azione delle RNA binding

proteins (RBPs), che agiscono selettivamente per degradare o stabilizzare i loro mRNA target (Trojanowicz , et al., 2011).

Le RNA binding proteins sono una famiglia di proteine in grado di legare l'RNA a doppio o a singolo filamento formando i complessi ribonucleoproteici (RNPs) (Glisovic et al., 2008; Lunde et al., 2007). Le cellule eucariote producono numerosissime RBPs, ognuna delle quali ha un'attività di legame dell'RNA e interazioni proteina-proteina uniche. Tale legame avviene grazie alla presenza di uno o più domini, i quali possono essere presenti in molteplici combinazioni, dando origine a numerosissime proteine diverse in grado di interagire in maniera specifica con tutti i possibili mRNA target (Lunde et al., 2007).

Le RBPs sono caratterizzate da un'elevatissima specificità di legame con i loro RNA target attraverso il riconoscimento della loro sequenza specifica e delle loro strutture secondarie. La prima interazione tra RBPs ed RNA avviene durante la trascrizione del messaggero e in alcuni casi permane fino a quando la proteina non viene degradata, mentre in altri casi il legame proteina-RNA è solamente di tipo transitorio, al fine di controllare eventi quali lo *splicing*, la maturazione, il trasposto e la localizzazione dell'RNA (Stefl et al., 2005).

### La struttura delle RNA binding proteins

Come già detto in precedenza, il legame tra le RBPs e l'RNA avviene attraverso particolari domini proteici che permettono il riconoscimento delle specifiche sequenze dei target. Tra i domini proteici delle RBPs più studiati troviamo: il *RNA-binding domain* (RBD) (detto anche *RNA recognition motif* (RRM)), il *K-homology domain* (KH di tipo I e di tipo II); il *GGG* (Arg-Gly-Gly) *box*, il *Sm domain*, il *DEAD/DEAH box*, lo *zinc finger*, il *RNA-binding domain* a doppio filamento (dsRBD), il *cold-shock domain*, il *Pumilio/FBF domain* (PUF); il *Piwi/Argonaute/Zwille domain* (PAZ) (Glisovic et al., 2008).

Tra questi i domini i più importanti sono gli RRM, gli *zinc finger* e i dsRBDs.

Il dominio *RNA recognition motif* o RRM è il dominio più studiato in letteratura ed è anche quello più diffuso nelle RBPs. Costituito da una sequenza di circa 90 aminoacidi con

struttura secondaria ad  $\alpha\beta$ -sandwich ( $\beta_1\alpha_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4$ ), il dominio RRM è in grado di legare 2-8 nucleotidi di una molecola di RNA a singolo filamento. Questo *recognition motif* è coinvolto in numerose funzioni della cellula, come ad esempio l'elaborazione dell'mRNA e dell'rRNA, lo *splicing*, la regolazione della traduzione, l'esportazione e la localizzazione dell'RNA e la sua stabilizzazione (Stefl et al., 2005, Clery et al., 2008; Glisovic et al., 2008). Il dominio dsRBD è costituito da 70-75 aminoacidi con struttura  $\alpha\beta\beta\alpha$  ed è coinvolto nel legame di RNA a doppio filamento. Questo tipo di dominio è estremamente importante in meccanismi di maturazione e localizzazione dell'RNA, ma soprattutto nei fenomeni di *RNA interference* e repressione della traduzione (Stefl et al., 2005).

I domini *zinc finger* sono tra i più comuni DNA binding domain, inoltre sono anche in grado di riconoscere e legare l'RNA a singolo filamento. I domini *zinc finger* sono caratterizzati da una struttura  $\beta\beta\alpha$  in cui i foglietti  $\beta$  e l' $\alpha$ -elica sono collegati attraverso un molecola di zinco (Stefl et al., 2005).

### Le funzioni delle RNA binding proteins

L'RNA appena prodotto viene immediatamente legato da RBPs che vanno a regolare ogni aspetto del suo metabolismo e della sua funzione. Infatti le RBPs hanno un ruolo fondamentale nel controllo post-trascrizionale dell'RNA: *splicing*, poliadenilazione, stabilizzazione, localizzazione e traduzione dell'mRNA. Inoltre le RBPs non solo influenzano questi processi, ma forniscono anche un collegamento tra di essi (Fig.1) (Glisovic et al., 2008).

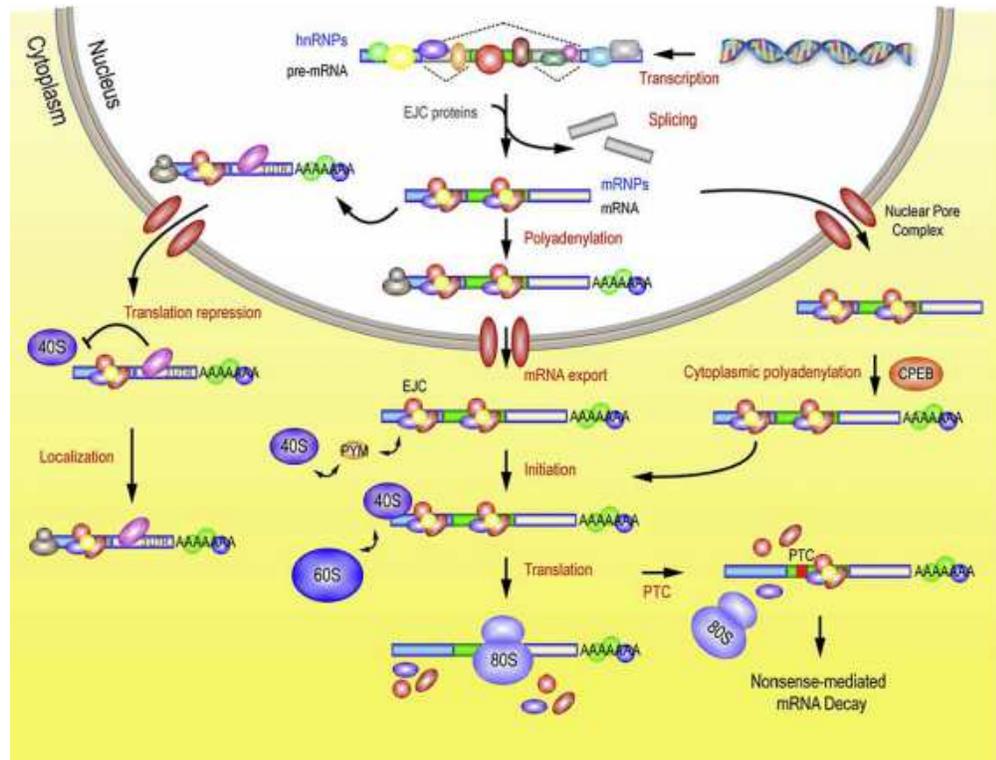


Figura 1. Le funzioni delle RBPs nella regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica (Glisovic et al., 2008).

Lo *splicing* alternativo è un meccanismo attraverso il quale diverse forme di mRNA vengono originate dallo stesso gene attraverso una diversa incorporazione degli esoni nella molecola di messaggero maturo. Questo fenomeno gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo e nella fisiologia delle cellule. Si stima che più del 90% dei geni umani esprima diversi mRNA attraverso il fenomeno dello *splicing* alternativo (Zhou e Fu, 2013). Alla base di questo importantissimo meccanismo troviamo le RNA binding proteins ed in particolare le proteine SR, una famiglia di RBPs caratterizzata dalla presenza del dominio *Arg/Ser-rich* (RS), che svolgono ruolo fondamentale nello *splicing* in quanto costituiscono lo spliceosoma (Zhou e Fu, 2013).

Un altro meccanismo di controllo post-trascrizionale della regolazione genica è la poliadenilazione dell'mRNA, la quale ha un forte effetto sul suo trasporto, efficienza di traduzione e stabilità. La poliadenilazione è un processo in cui il trascritto viene prima scisso tra la sequenza AAUAAA a monte e la sequenza ricca di U/GU a valle del sito di

clivaggio; a questo punto la Polimerasi-poli(A) aggiunge la coda di poli(A) al prodotto del clivaggio (Minvielle-Sebastia et al., 1999). Uno degli attori principali di questo processo è il complesso CPSF, formato da quattro polipeptidi, tra cui le RBPs CPSF-160 e CPSF-30, che si legano al sito AAUAAA e che interagiscono con la poli(A) binding protein nucleare (PABPN1) andando ad attivare la polimerasi- poli(A) (Glisovic et al., 2008).

Normalmente, una volta che l'mRNA è giunto a completa maturazione, questo viene esportato dal nucleo al citoplasma, dove avverrà la sua traduzione. Per far sì che l'mRNA maturo venga esportato è fondamentale che i processi di trascrizione, *splicing* e poliadenilazione siano stati completati poiché attraverso questi tre step di maturazione dell'mRNA si ha la formazione nel nucleo di un complesso *cargo-carrier* che verrà poi esportato nel citoplasma attraverso pori nucleari. L'elemento chiave di questo trasporto è TAP/NXF1 che si lega all'mRNA attraverso l'RBPs Aly/REF (Glisovic et al., 2008).

La localizzazione dell'mRNA è un punto fondamentale della regolazione dell'espressione genica. Il fatto che solo l'mRNA localizzato a livello citoplasmatico possa essere tradotto fa sì che le proteine prodotte si trovino già nel loro sito d'azione. Anche in questo caso il ruolo chiave del processo di localizzazione dell'mRNA sono le RBPs. Ad esempio, ZBP1 (*Zipcode binding protein 1*) è una RBP con quattro domini KH e un RBD attraverso i quali è in grado di legare il 3'-UTR dell'mRNA della  $\beta$ -actina nel suo sito di trascrizione. Il legame ZBP1-RNA nel nucleo fa sì che l'mRNA venga esportato nel citoplasma dove ZBP1 ne previene la precoce traduzione bloccandone i siti di inizio. La traduzione avrà inizio solamente quando il complesso ZBP1-RNA raggiungerà la sua destinazione alla periferia della cellula. Una volta che l'mRNA della  $\beta$ -actina ha raggiunto la sua corretta localizzazione, le proteine Src promuovono la fosforilazione di ZBP1 a livello del residuo di tirosina responsabile del legame con l'RNA: in questo modo il legame ZBP1-RNA viene meno e la traduzione può avere inizio (Hüttelmaier et al., 2005).

## Gli AU-rich elements

Gli *Adenylate-Uridylate-rich elements* (AU-rich elements o AREs) sono dei siti caratterizzati dalla presenza di molteplici residui di adenina ed uracile e localizzati a livello delle regioni non tradotte al 3' di numerosi mRNA, inclusi quelli di fattori di crescita, citochine e proto-oncogeni (Brennan e Steitz, 2001).

Nel corso degli anni, numerosi studi hanno evidenziato l'importanza dei siti AREs nella destabilizzazione dell'mRNA (Treisman, 1985; Shaw e Kamen, 1986; Wilson e Treisman, 1988). In particolare Shaw e Kamen hanno dimostrato che l'inserzione di una sequenza di 51 nucleotidi contenente un sito ARE presente dal 3'UTR dell'mRNA di GM-CSF (*granulocyte monocyte-colony stimulating factor*) al 3'UTR dell'mRNA della  $\beta$ -globina portava alla rapida degradazione di quest'ultima attraverso un meccanismo di rapida rimozione della coda di poli(A) dalla molecola di messaggero (Shaw e Kamen, 1986).

Gli AREs sono stati suddivisi in tre classi sulla base della loro sequenza e del tipo di degradazione a cui va incontro l'mRNA che li contiene (Chen e Shyu, 1995). Gli AREs di classe I, come ad esempio quelli presenti nell'mRNA di *c-fos*, contengono da una a tre ripetizioni della sequenza AUUUA all'interno o in prossimità di una regione ricca di uracili. Gli AREs di classe II, presenti ad esempio nel messaggero di GM-CSF, sono caratterizzati dalla presenza di almeno due copie sovrapposte del nonamero UUAUUUA(U/A)(U/A) all'interno di una regione ricca di uracili. Infine gli AREs di classe III, come quelli dell'mRNA di *c-jun*, si differenziano per l'assenza del pentamero AUUUA, in presenza di regioni ricche di uracile (Brennan e Steitz, 2001).

Il meccanismo attraverso il quale gli AREs portino alla degradazione dell'mRNA non è ancora del tutto chiaro. Tuttavia è stato identificato come i siti AREs vengano riconosciuti e legati da RBPs come TTP, AUF1 e HuR (Elliott et al., 2011). Ad esempio AUF1 è in grado di legare gli AREs attraverso i suoi RRM; inoltre AUF1 può interagire con eIF4G (*translation initiation factor*) e le proteine che legano i poli(A). Tutto ciò fa presumere che AUF1 influenzi la degradazione dell'mRNA attraverso il taglio della coda di poli(A) (Elliott

et al., 2011). Viceversa, il legame di HuR con i siti ARE sembra avere un effetto stabilizzante sugli mRNA poiché sembra competere con altre proteine aventi effetti destabilizzanti sull'mRNA (Brennan e Steinz, 2001).

### Le famiglie di RNA binding protein

Il gruppo delle RNA binding proteins include numerose famiglie tra cui le proteine Hu, note per la capacità di legare le sequenze ricche in AU a livello della regione non tradotta al 3' (3'UTR) dell'mRNA (Srikantan et al., 2012); inoltre vi sono molte altre RBPs come ad esempio le *T-cell intracellular antigen 1* (TIA-1) e le *TIA-1 related* (TIAR); la Tristertraprolina (TTP); la proteina del ritardo mentale dell'X fragile (FMRP); la *polypyrimidine tract-binding protein* (PTB); la nucleolina; le ribonucleoproteine eterogenee nucleari (hnRNP) A1, A2 e C1/C2, che sono in grado di influenzare la stabilità dell'RNA o la sua traduzione attraverso l'interazione con le regioni non tradotte sia al 3' che al 5' dell'mRNA target (Abdelmohsen, 2012); le *Src associated in mitosis of 68 kDa* (Sam68).

La famiglia Hu è composta da quattro proteine: HuA o HuR, anche noto come *embryonic lethal abnormal vision Drosophila-like 1* (ELAVL1); HuB, HuC e HuD. Tra i vari membri della famiglia Hu, quello di maggior interesse è HuR poiché, a differenza degli altri tre che sono espressi solo a livello neuronale, è espresso in modo ubiquitario. Questa RBP lega i suoi mRNA target in corrispondenza di sequenze arricchite in adenina e uracile (AU) o solo uracile (U) (AREs). Il legame di HuR con i suoi target ne incrementa la stabilità e la traduzione. I target di HuR sono coinvolti in molteplici processi come ad esempio la crescita cellulare, la sopravvivenza, la proliferazione, la risposta allo stress, la senescenza e la carcinogenesi (Hinman et al., 2008; Abdelmohsen et al., 2010).

La famiglia delle proteine hnRNP include numerose RBPs (hn RNP A, B, C, D, E, F, H, I, K, L, M, Q, R ed U). Uno degli elementi più importanti di questa famiglia è hnRNP D, meglio noto come *AU-binding factor 1* (AUF1). Dal gene che codifica per AUF1 si possono generare, per *splicing* alternativo degli esoni 2 e 7, quattro diverse isoforme proteiche

(p37, p40, p42 e p45), tutte caratterizzate dalla presenza di due RRM che mediano il legame con l'mRNA (Gratacos et al., 2010). Il legame di AUF1 con i suoi target avviene in corrispondenza di sequenze arricchite in AU a livello del 3'UTR e tale legame promuove principalmente la degradazione dell'mRNA attraverso il reclutamento del proteasoma (Laroia et al., 1999). I target noti di AUF1 sono mRNA coinvolti in diversi processi cellulari; tra i più importanti si possono citare: la ciclina D1 e gli inibitori delle CDK p21, p27 e p16INK4a, coinvolti nel ciclo cellulare; NOS (*inducible nitric oxide synthase*) e IL6 nella risposta allo stress; BCL2 e GADD45a (*growth arrest and DNA damage inducible protein alpha*) nell'apoptosi (Abdelmohsen, 2012). Diversi studi hanno inoltre dimostrato che AUF1 è anche in grado di promuovere la stabilità e la traduzione di alcuni suoi target, come ad esempio c-Myc e IL1 $\beta$  (Liao et al., 2007; Sarkar et al., 2008).

Così come descritto per AUF1, anche le proteine TIA-1 e TIAR, grazie alla presenza di tre domini RRM, legano i loro target in regioni arricchite in AU a livello del 3'UTR e ne inibiscono la traduzione attraverso il sequestro degli mRNA legati all'interno di granuli di stress in seguito a cambiamenti del microambiente cellulare (Kim et al., 2011). Le proteine TIA-1 sono inoltre coinvolte nel controllo dello *splicing* alternativo del pre-mRNA attraverso il legame con sequenze arricchite in uracile a livello degli introni e il riconoscimento di siti di *splicing* atipici. Le proteine TIAR inoltre sono in grado di legarsi fortemente al DNA a singolo filamento in corrispondenza di regioni ricche di timina; questo legame permette il posizionamento delle TIAR in modo tale da modulare la trascrizione e aiutare a localizzare TIAR in prossimità di trascritti con sequenze ricche di uracili al momento della trascrizione (Kim et al., 2011).

Altre RBPs che svolgono la funzione di degradare i loro target sono il *nuclear factor 90* (NF90), che è coinvolto nella soppressione di mRNA coinvolti nel ciclo cellulare, la traduzione, nella proliferazione e nella divisione cellulare (Kuwano et al., 2010); FMRP che è coinvolta nella regolazione di geni coinvolti nella plasticità sinaptica (Bassel et al., 2008); la tristetraprolina (TTP), una proteina *zinc finger* che interagisce con gli mRNA di numerose

interleuchine coinvolte in ciclo cellulare, infiammazione e carcinogenesi (Sanduja et al., 2012).

Nucleolina interagisce con i suoi target a livello di regioni arricchite in adenina e uracile o in guanina per regolarne la stabilità e la traduzione. I target di questa RBP includono geni coinvolti in diversi processi cellulari, come proliferazione, sopravvivenza, ciclo cellulare, ma anche nello sviluppo di patologie come ad esempio il cancro e l'Alzheimer (Abdelmohsen, 2012).

### RNA binding protein e cancro

Come descritto nei precedenti paragrafi, le RNA binding protein ricoprono un ruolo fondamentale per la cellula. Per questo motivo appare evidente che mutazioni che ne alterano l'attività o che modificano i loro mRNA target, possano essere deleterie per il controllo dell'espressione genica e che ciò possa portare allo sviluppo di diverse patologie, come atrofie muscolari, disturbi neurologici e cancro (Kechavarzi e Janga, 2014; Wurth e Gebauer, 2014).

Rispetto a quanto accade nelle cellule normali, l'espressione alterata delle RBPs nelle cellule neoplastiche, può portare alla variazione del pattern di RBP presenti in una cellula. Ad esempio se delle RBPs sono mutate o over-esprese in cellule tumorali, queste si possono associare, a causa di un'affinità alterata ai target, a diverse molecole di RNA portando alla formazione di complessi ribonucleoproteici anomali (Kim et al., 2009) (Fig. 2). Inoltre, la presenza di RBPs o di elementi di legame di queste mutati può portare a processi metabolici dell'RNA alterati: ad esempio si potrebbero verificare fenomeni di *splicing* alternativo aberranti, decadimento incontrollato, delocalizzazione, traduzione sregolata degli mRNA target.

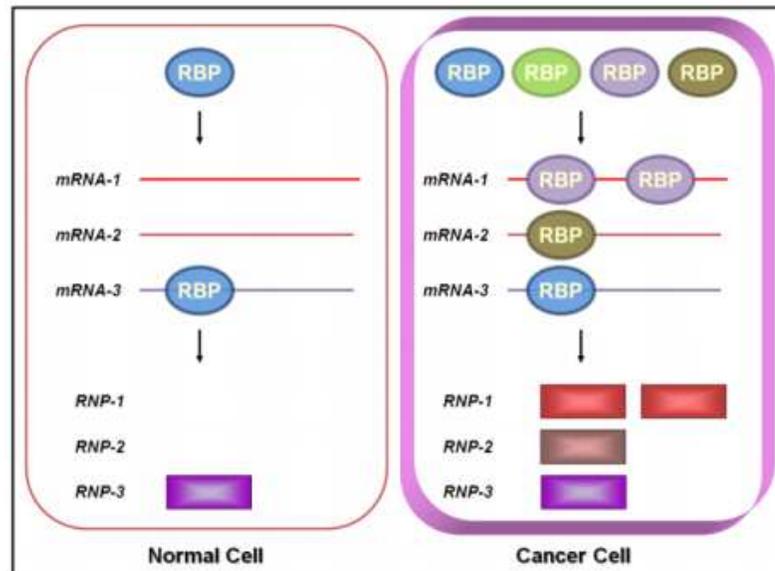


Figura 2. Formazione aberrante dei complessi Ribonucleoproteici (RNP) nelle cellule tumorali. Nelle cellule normali le RBPs legano gli RNA target e formano RNPs specifici. L'espressione alterata di un'RBP provoca una variazione dell'affinità per gli RNA con conseguente associazione a target errati e formazione di RNPs aberranti nelle cellule tumorali (Kim et al., 2009).

Il cancro è una patologia eterogenea e complessa il cui sviluppo è associato a molteplici fattori che risultano essere espressi in modo aberrante. Data l'importanza delle RBPs nel controllo dell'espressione genica e di altri importantissimi processi cellulari, non sorprende che anche queste proteine siano tra quei fattori che, qualora risultassero mutati, portano allo sviluppo del tumore (Fig. 3).

La deregolazione dei fattori di *splicing* può determinare uno *splicing* alternativo di numerosi trascritti nelle cellule cancerose con la conseguente variazione del loro proteasoma.

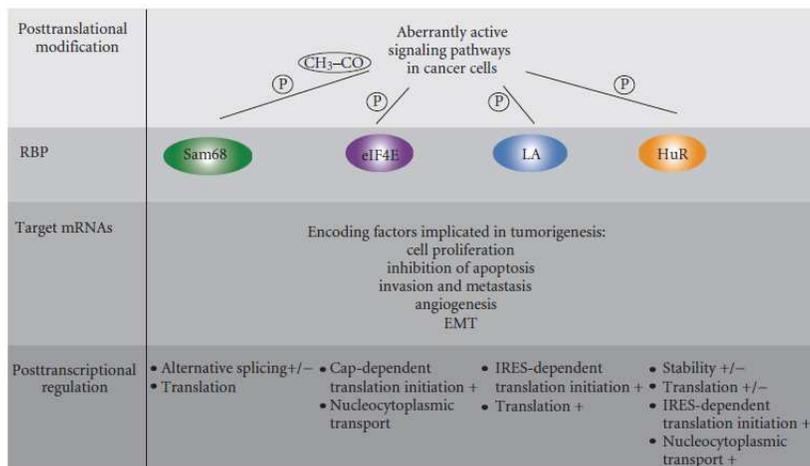


Figura 3. Regolazione della tumorigenesi mediata da Sam68, eIF4E e HuR. Nelle cellule tumorali le RBPs vengono modificate a livello post-traduzionale dall'attivazione aberrante di diverse vie di segnalazione. Le RBPs così attivate legano i loro target codificanti per proteine coinvolte nella tumorigenesi. Nella figura vengono indicati i punti chiave del metabolismo dell'mRNA. I simboli (+) e (-) indicano rispettivamente up- o down-regolazione. P e CH<sub>3</sub>-CO indicano fosforilazione e acetilazione delle RBPs. EMT: transizione epitelio-mesenchimale (Wurth, 2012).

Ad esempio Sam68, elemento della famiglia delle *signal transduction and activation of RNA* (STAR) RBPs, è un fattore di *splicing* la cui attività viene regolata attraverso vie di segnalazione che spesso risultano deregolate nelle cellule tumorali. Inoltre Sam68 risulta essere over-espresso in diverse neoplasie come i tumori al seno, prostata e reni (Wurth, 2012). Il coinvolgimento di Sam68 nello sviluppo tumorale è legato anche ai suoi target. Ad esempio Sam68 è responsabile dell'inclusione dell'esone 5 nel pre-mRNA di CD44, una molecola della membrana cellulare che è coinvolta nella proliferazione delle cellule tumorali e che viene generata attraverso l'inclusione di 10 possibili esoni (Wurth, 2012; Cooper, 1995). Sam68 inoltre regola lo *splicing* alternativo della ciclina D1, un proto-oncogene frequentemente deregolato nei tumori (Paronetto et al., 2010; Wurth, 2012). Sam68 inoltre, promuove la formazione di SF2/AFS, un fattore di *splicing* della famiglia delle proteine SR che agisce anche come proto-oncogene e che risulta essere over-espresso in diversi tumori. Lo *splicing* alternativo mediato da SF2/ASF può inattivare oncosoppressori come il *Bridging Integrator 1* (BIN1) o attivare oncogeni come MNK2 o la

chinasi S6K1 (Kim et al., 2009; Karni et al., 2007). Inoltre SF2/ASF è coinvolto nel metabolismo del pre-mRNA di  $\Delta$ Ron, un fattore coinvolto nella transizione epitelio-mesenchima (EMT) nelle cellule tumorali di colon (Valacca et al., 2010; Wurth, 2012).

Un altro importante punto di regolazione dell'espressione di oncosoppressori e oncogeni nelle cellule tumorali è la traduzione dell'mRNA. Per questo motivo l'alterazione dei fattori di traduzione gioca un ruolo cruciale nella tumorigenesi. Un fattore di traduzione molto importante è *cap-binding protein* eIF4A (*eukaryotic initiation factor 4E*). Nel citoplasma eIF4E lega il cappuccio di 7-metilguanilato al 5' dell'mRNA ed interagisce con eIF4G, responsabile del reclutamento del ribosoma. Numerosi studi hanno dimostrato che eIF4E è over-espresso in diversi tipi di tumore (come mammella, prostata, stomaco, colon, polmoni, pelle e linfomi) e che la sua espressione spesso correla con l'aggressività del tumore e una cattiva prognosi (Hsieh e Ruggero, 2010; Wurth, 2012). È stato inoltre dimostrato che l'aumento di espressione di eIF4E non induce un aumento della sintesi proteica globale, ma solo di un numero limitato di mRNA, la maggior parte dei quali codificanti per proteine oncogeniche (Wendel et al., 2007). Tra i target influenzati dall'over-espressione di eIF4E troviamo componenti del ciclo cellulare, come la ciclina D1, CDK2, c-MYC, MCL-1, BCL-2; fattori angiogenetici, come VEGF, FGF-2, PDGF; e fattori implicati nell'invasività cellulare, come le metalloproteasi (Wurth, 2012). L'importanza di eIF4E nello sviluppo del cancro è anche dovuta al fatto che questo fattore di traduzione è regolato da vie di segnalazione che risultano essere amplificate nei tumori, come ad esempio la via del phosphatidyl-inositol 3-kinase-Akt-mTOR. In particolare, le proteine che legano eIF4E (4E-BPs) inibiscono l'interazione di eIF4E con eIF4G, bloccando la formazione del complesso che lega il cappuccio al 5' dell'mRNA. mTOR fosforila le 4E-BPs che perdono così la loro affinità per eIF4E, con il conseguente incremento della sua attività (Hsieh e Ruggero, 2010; Silvera et al., 2010; Wurth, 2012).

La è una RNA binding protein multifunzionale che si localizza principalmente a livello del nucleo, ma è anche in grado di spostarsi nel citoplasma e per questo motivo è coinvolta

sia nella maturazione dell'mRNA che nella sua traduzione. Nel nucleo La lega i suoi target in via di trascrizione all'estremità del 3' proteggendoli dalla degradazione; in seguito a fosforilazione o clivaggio migra nel citoplasma dove ne regola la traduzione (Wurth e Gebauer, 2015).

La è in grado di interagire con mRNA sia cellulari che virali; regola le IRES, sequenze nucleotidiche con un particolare folding che sono in grado di reclutare i ribosomi anche in assenza del cappuccio al 5'; e l'iniziazione della traduzione *cap*-indipendente dell'RNA. In presenza di stress cellulare, così come nelle cellule tumorali, la normale traduzione *cap*-dipendente viene down-regolata, mentre quella IRES-dipendente è favorita. La è una RBP appartenente alla classe delle *IRES trans-acting factors* (ITAFs) che regola la traduzione di mRNA coinvolti in proliferazione cellulare (ciclina D1), angiogenesi (VEGF) e apoptosi (XIAP) (Wurth, 2012). Come già visto per le precedenti RBPs, anche La risulta essere over-espressa in diversi tipi di neoplasie, come leucemia mieloide cronica e carcinoma orale a cellule squamose (OSCC) (Sommer et al., 2011; Petz et al., 2012).

## HuR

Le proteine ELAV/Hu sono una famiglia di RNA binding proteins chiamate *Embryonic lethal abnormal vision* (ELAV) *proteins* identificate originariamente in *Drosophila Melanogaster* dove furono ritenute indispensabili per lo sviluppo neurale (Campos et al., 1985). Nei mammiferi, la famiglia ELAV/Hu è costituita da quattro membri altamente conservati che includono HuR/HuA/ELAVL1, espresso in numerosi tipi cellulari, e i tre membri Hel-N1/HuB/ELAVL2, HuC/ELAVL3, HuD/ELAVL4, che vengono espressi unicamente a livello dei tessuti neuronali (Wang et al., 2013).

HuR regola una miriade di trascritti sia a livello della stabilità dell'mRNA che a livello della traduzione. HuR è un potente promotore della proliferazione e della sopravvivenza cellulare, ma durante condizioni estreme di stress, può anche promuovere fenomeni apoptotici mediati dalle caspasi. Per questo motivo questa RBP è estremamente

importante per la regolazione di vie metaboliche che mediano sia la sopravvivenza della cellula che la sua morte (Govindaraju e Lee, 2013). HuR, inoltre, è la principale RBP nota per il suo coinvolgimento nello sviluppo tumorale (Abdelmhsen et al., 2011; Wurth, 2012); infatti, tra i suoi mRNA target si possono trovare trascritti che codificano per importanti effettori della tumorigenesi, oncogeni, come c-myc; cicline (A, B1, D1); fattori di crescita, come VEGF, TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ ; fattori anti-apoptotici, come Bcl-2 e Mcl-1, p21 e p27 (Wurth e Gauber, 2015). Normalmente HuR è localizzato prevalentemente a livello nucleare, ma in seguito a stimoli, trasloca nel citoplasma dove è coinvolto nella regolazione di trascritti contenenti le sequenze ARE, elementi ricchi di uracile o adenina ed uracile, a livello del 3' UTR. HuR, inoltre, è in grado di legare i suoi target anche a livello del 5' UTR o in corrispondenza di sequenze introniche, suggerendo che possa quindi agire anche a livello della maturazione del pre-mRNA (Lebedeva et al., 2011; Wurth e Gauber, 2015). L'over-espressione di HuR è stata osservata in molteplici tipologie di cancro, tra cui linfoma, tumore allo stomaco, mammella, pancreas, prostata, colon, pelle, polmoni, ovaie e cervello (Wurth e Gauber 2015). Inoltre è stato dimostrato che l'accumulo a livello citoplasmatico di questa RBP correla con l'aggressività tumorale e può essere utilizzato come fattore prognostico di scarso esito clinico in alcuni tipi di cancro (Wurth, 2012).

### Il gene e la regolazione dell'espressione dell'mRNA di HuR

Il gene che codifica per la proteina HuR è stato identificato e clonato per la prima volta nel 1996 da Ma e colleghi ed è localizzato sul cromosoma 19p13.2 (Ma et al., 1996). La sequenza del gene è composta da 47087 basi, contiene 6 esoni e codifica per una proteina di 326 aminoacidi (Ma et al., 1996)(Fig. 4).

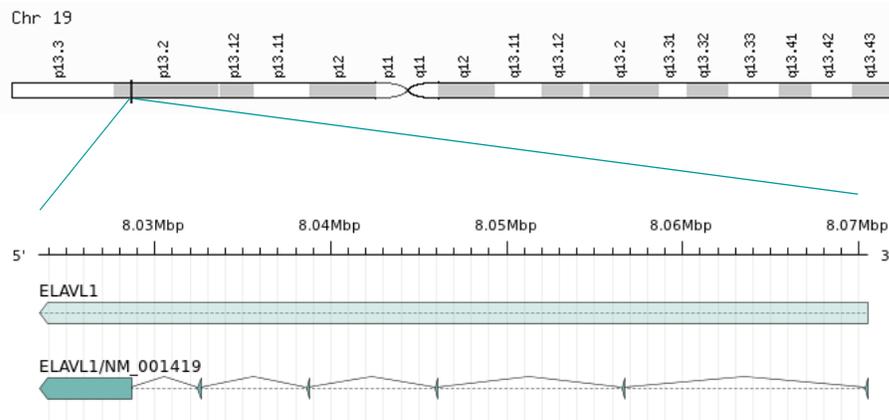


Figura 4. Rappresentazione della localizzazione cromosomica del gene di HuR e del suo trascritto.

Kang et al. hanno dimostrato che l'espressione di HuR è mediata dalla via metabolica del *phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/nuclear factor kappa B (NF-κB)* (Kang et al., 2008). Nel suo studio, Kang ha dimostrato la presenza di un sito di legame per NF-κB all'interno del promotore del gene *HuR*, distante 133 basi a monte del sito di inizio della trascrizione.

Un secondo livello di regolazione dell'espressione di *HuR* avviene attraverso la presenza di due siti di inizio della trascrizione alternativi, localizzati approssimativamente 150 e 20 basi a monte della regione codificante (Govindaraju e Lee, 2013). La regione del 5' UTR dei due diversi trascritti prodotti da questi siti è piuttosto differente: un lungo trascritto contenente una regione ricca in guanina e citosina o un mRNA più breve, contenente una regione ricca in adenina e tirosina e che viene tradotto in modo molto più rapido del primo (Ayupova et al., 2009; Govindaraju e Lee, 2013). Durante la normale crescita cellulare i due siti di inizio della trascrizione vengono utilizzati con la stessa frequenza, ma in presenza di stress metabolico, l'espressione dell'mRNA più corto viene incrementata, attraverso la presenza di diversi siti di legame per Smad 1/5/8 sulla regione del 5' del trascritto più lungo (Govindaraju e Lee, 2013).

Il gene *HuR* codifica, inoltre, per due varianti di siti di poliadenilazione a livello del 3'UTR del trascritto. Una variante porta alla formazione di una molecola più lunga e instabile

contenente siti ARE; mentre l'altra variante, che è quella più frequente, è più breve, stabile e priva dei siti ARE (Al-Ahmadi et al., 2009). È stato dimostrato che HuR è in grado di autoregolare la propria espressione genica attraverso il controllo della produzione di queste due varianti di trascritto mediante meccanismi di *feedback* negativo. Quando HuR è localizzato nel nucleo lega il proprio pre-mRNA incrementando la produzione della variante più lunga e instabile di trascritto. In questo modo i livelli di proteina HuR rimangono fisiologicamente costantemente bassi (Govindaraju e Lee, 2013). Quando HuR trasloca a livello citoplasmatico il ciclo del *feedback* negativo viene interrotto portando all'incremento dei livelli di HuR e alla possibile trasformazione neoplastica della cellula. Oltre all'autoregolazione di HuR, anche altre RBPs sono coinvolte nei processi di stabilizzazione o degradazione del suo mRNA, come ad esempio RNPC1 o la tristetraprolina (TTP) (Fig. 5).

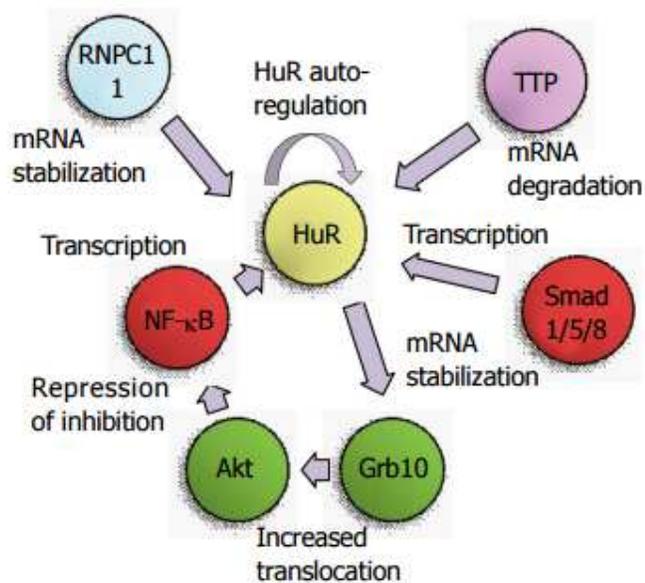


Figura 5. Regolatori traduzionali e post-traduzionali di HuR. TTP: tristetraprolina; Akt: chinasi B; NF- $\kappa$ B: Nuclear factor kappa B (Govindaraju e Lee, 2013).

Recenti studi hanno dimostrato che anche numerosi miRNA, come miR-9, miR-34a, miR-16, miR-125a, miR-29a, miR-200c, miR-519, svolgono ruoli cruciali nella regolazione

dell'espressione di HuR attraverso l'interazione con specifici siti localizzati su 3' e 5' UTR dell'mRNA di HuR (Wang et al., 2013).

### La proteina

La proteina HuR è composta da 360 aminoacidi, ha un peso molecolare di circa 36 kDa e un punto isoelettrico (pI) teorico di 9.23.

HuR è in grado di riconoscere e legare gli AREs di classe I e II, attraverso tre *RNA recognition motif* classici (RRMs). Poiché la rapida degradazione dell'RNA mediata dai siti ARE è un importante meccanismo post-trascrizionale di regolazione genica, la diretta interazione HuR- AREs inibisce di questo meccanismo, portando alla stabilizzazione dell'mRNA e alla traduzione della proteina.

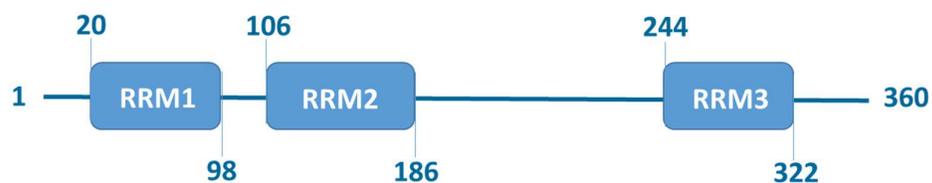


Figura 6. Rappresentazione schematica della proteina HuR e dei suoi tre domini RRM.

I primi due RRM, localizzati all'estremità N-terminale della proteina, sono deputati al legame selettivo con gli elementi AREs, mentre il terzo dominio (RRM3) contribuisce all'interazione con la coda di poli(A) degli mRNA target o degli altri ligandi (Brennan e Steitz, 2001; Wang et al., 2013).

La proteina HuR è soggetta a molteplici forme di regolazione post-traduzionale. Un fondamentale meccanismo di controllo dell'attività di HuR è dato, ad esempio, dalla sua localizzazione. La fosforilazione di HuR da parte di diverse chinasi, come la *checkpoint kinase 2* (Chk2), Cdk1, p38, PKC, così come la metilazione mediata da CARM1, regolano i livelli citoplasmatici di HuR e il suo legame con gli mRNA target (Govindaraju e Lee, 2013) (Fig. 7).

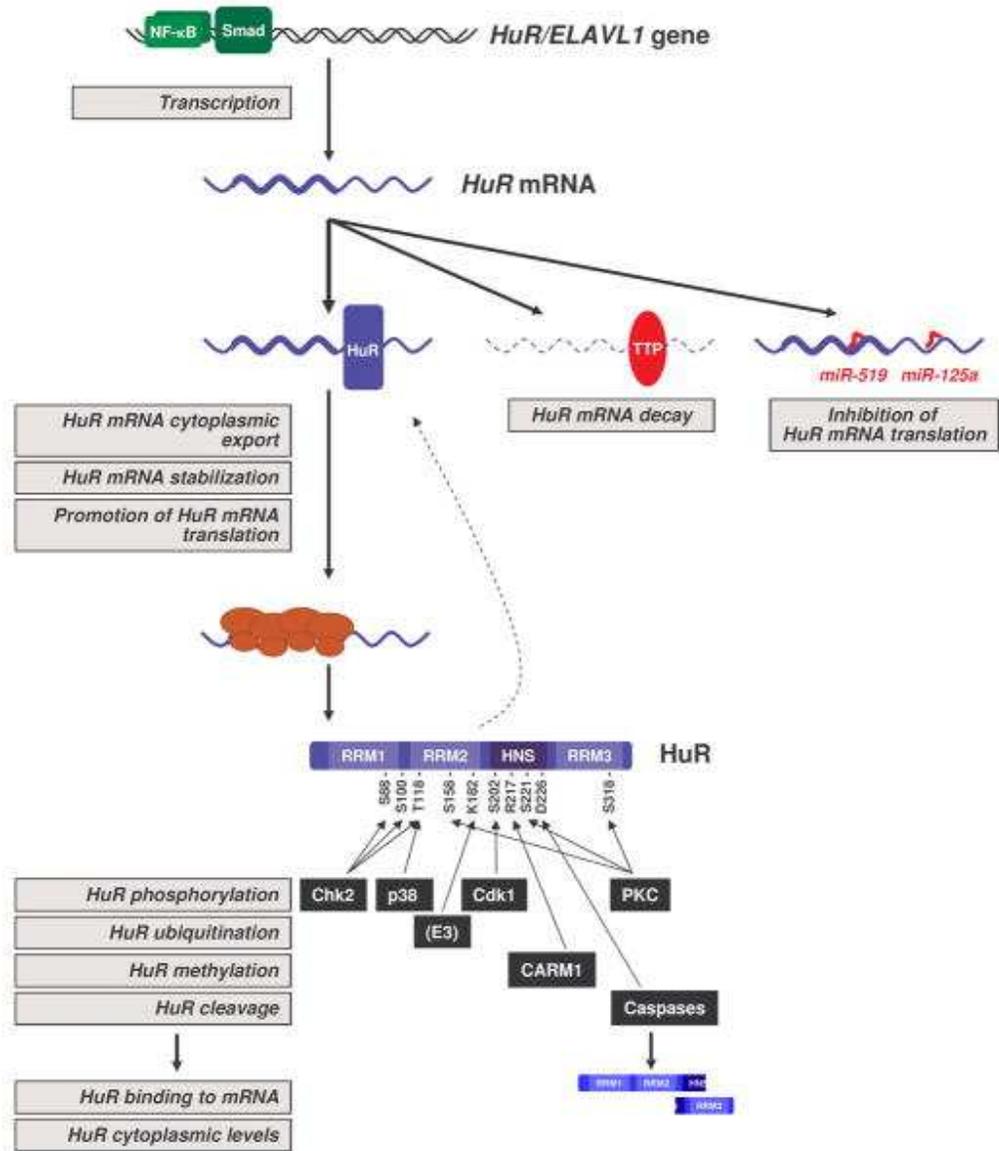


Figura 7. Regolazione dell'espressione e della funzione di HuR. La trascrizione del gene HuR/ELAVL1 è controllata dal fattore di trascrizione NF-κB. HuR è coinvolto nell'auto-regolazione attraverso l'esportazione nel citoplasma, la stabilizzazione e la traduzione del proprio mRNA. Allo stesso tempo HuR viene negativamente controllato da TTP, che ne promuove la degradazione, e da microRNA come miR-125a e miR-519, che ne inibiscono la traduzione. La proteina HuR è inoltre soggetta a fosforilazione ad opera di Chk2, che ne influenza l'interazione con i target; di Cdk1, che ne influenza i livelli citoplasmatici; di p38 e PKC. La metilazione ad opera di CARM1 è responsabile della localizzazione sub-cellulare di HuR e dell'interazione con i target. L'ubiquitinazione di HuR, mediata da una ligasi non ancora nota (E3), ne controlla la stabilità. Infine le caspasi possono tagliare HuR in due frammenti con diverse proprietà cellulari (Srikantan e Gorospe, 2012).



MAPK, fosforilano HuR a livello dei residui di serina e treonina alterandone la sua localizzazione subcellulare (Abdelmohsen et al., 2007; Kim et al., 2008; Lafarga et al., 2009).

L'accumulo citoplasmatico di HuR è influenzato anche dalla sua metilazione ad opera di CARM1 (*coactivator-associated arginine methyltransferase 1*) e dall'ubiquitinazione da parte di ligasi E3 (Kim et al., 2008). Viceversa la presenza e l'importazione di HuR nel nucleo sembra essere associata all'attivazione di AMPK, che determina l'acetilazione della lisina 22 e la fosforilazione sulla serina 105 dell'importina  $\alpha 1$ .

Un altro meccanismo di controllo dell'azione di HuR è la sua interazione con i miRNAs; piccole molecole (circa 22 nucleotidi) di RNA non codificante coinvolte nella regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica. L'interazione tra HuR e miRNA è complessa, poiché i miRNA sono in grado di regolare direttamente l'espressione di HuR e al tempo stesso quest'ultimo è in grado di inibire l'affetto soppressorio o attivatorio dei miRNA sui loro target (Govindaraju e Lee, 2013). Il primo miRNA identificato come regolatore di HuR è stato il miR-519 (Abdelmohsen et al., 2008). MiR-519 lega l'mRNA di HuR sia a livello della sua sequenza codificante che nella regione al 3'UTR con la conseguente riduzione dei livelli di HuR tradotti (Abdelmohsen et al., 2010). Oltre al miR-519, ad oggi, sono stati identificati anche numerosi altri miRNA in grado di ridurre i livelli di HuR nelle cellule neoplastiche. Tra questi troviamo i miR-9, miR-16, miR-125a, miR-34a (Govindaraju e Lee, 2013).

I regolatori endogeni che influenzano l'espressione e le funzioni di HuR ad oggi individuati sono elencati in Tabella 1 (Wang et al., 2013).

Tabella 1. Regolatori endogeni dell'espressione e delle funzioni di HuR

Regolatori	Meccanismo	Siti di legame	Effetto su HuR
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Trascrizione	Promotore	HuR mRNA $\uparrow$
<b>Smad</b>	Trascrizione	Promotore	HuR mRNA $\uparrow$
<b>PKC <math>\alpha</math></b>	Fosforilazione	S158, S221	Legame dell'RNA $\uparrow$ , Accumulo citoplasmatico $\uparrow$
<b>PKC <math>\delta</math></b>	Fosforilazione	S318, S221	Legame all'RNA $\uparrow$ , Accumulo citoplasmatico $\uparrow$
<b>Cdk1</b>	Fosforilazione	S202	Accumulo citoplasmatico $\uparrow$
<b>Chk2</b>	Fosforilazione	S88, S100, T118	Legame dell'RNA $\uparrow$
<b>P38-MAPK</b>	Fosforilazione	T118	Accumulo citoplasmatico
<b>PI3K-AKT</b>	Trascrizione	Promotore	Legame di p65/RelA al promotore di HuR $\uparrow$
<b>AMPK</b>	Trascrizione	K22, S105 dell'importina $\alpha$ 1	Importazione nucleare HuR $\uparrow$
<b>miR-9</b>	Trascrizione	Sconosciuto	mRNA $\downarrow$ , Proteina $\downarrow$
	Post-trascrizionale	3UTR	
<b>miR-200c</b>	Sconosciuto	Sconosciuto	Interazione HuR-mRNA $\downarrow$
<b>miR-34a</b>	Post-trascrizionale	3UTR	HuR mRNA $\downarrow$ , Proteina HuR $\downarrow$
<b>miR-16</b>	Traduzione	3UTR	Proteina $\downarrow$
<b>miR-125a</b>	Traduzione	3UTR	Proteina $\downarrow$
<b>miR-519</b>	Traduzione	3UTR	Proteina $\downarrow$
<b>CARM1</b>	Metilazione	R217	Legame dell'RNA $\uparrow$ , Accumulo citoplasmatico $\uparrow$
<b>HuR</b>	Ubiquitinizzazione	K182	Stabilità proteina $\uparrow$
	Post-trascrizionale	Sito di poliadenilazione	Stabilità mRNA $\uparrow$

<b>Hu (B-D)</b>	Post-trascrizionale	Sito di poliadenilazione	Stabilità mRNA ↑
<b>TTP</b>	Post-trascrizionale	3UTR	Stabilità mRNA ↓
<b>pp32</b>	Interazione		Legame all'RNA ↓
<b>RNP C1</b>	Post-trascrizionale	RRM, 3UTR	Legame all'RNA ↑, Stabilità mRNA ↓
<b>Mdm2</b>	Ubiquitinizzazione	K283, K313, K326	Stabilità proteina ↑
<b>Hsf1</b>	Sconosciuto		Proteina ↑

Oltre ai regolatori endogeni sopra descritti, anche altri fattori, come ad esempio stimoli di stress quali radiazioni ultraviolette (UV), lipopolisaccaridi (LPS), composti chimici, citochine, alterazioni ambientali, infezioni virali e trattamenti ormonali, possono influenzare l'espressione e la localizzazione di HuR (Tabella 2) (Wang et al., 2013). Ad esempio uno stress moderato induce la traslocazione di HuR dal nucleo al citoplasma, in modo tale da promuovere la sopravvivenza della cellula. Anche alti livelli di stress, come stimoli pro-apoptotici o ipossia, promuovono la traslocazione di HuR nel citoplasma, ma in questo caso una volta che HuR è uscito dal nucleo, viene clivato a livello della lisina 182 dalle caspasi permettendo così alla cellula di attivare i processi apoptotici (Govindaraju e Lee, 2013).

Tabella 2. Fattori esterni che regolano l'espressione e le funzioni di HuR

<b>Regolatori</b>	<b>Effetto su HuR</b>
<b>UVR</b>	Accumulo citoplasmatico ↑
<b>Etanolo</b>	Accumulo citoplasmatico ↑
<b>LPS</b>	Accumulo citoplasmatico ↑
<b>SAHA</b>	Proteina ↓
<b>Tamoxifene</b>	Accumulo citoplasmatico ↑
<b>Gemcitabina</b>	Accumulo citoplasmatico ↑

<b>Ossido Nitrico</b>	mRNA ↓, proteina ↓
<b>Inibitore della HIV-proteasi</b>	Accumulo citoplasmatico ↑
<b>Inibitore del proteosoma MG132</b>	Accumulo citoplasmatico ↑
<b>Ipossia</b>	Accumulo citoplasmatico ↑
<b>Carenza di aminoacidi</b>	Accumulo citoplasmatico ↑
<b>Sali biliari</b>	Accumulo citoplasmatico ↑
<b>Siero</b>	Accumulo citoplasmatico ↑
<b>Privazione di poliammine</b>	Accumulo citoplasmatico ↑
<b>DHA</b>	Accumulo citoplasmatico ↑
<b>Tè verde</b>	Accumulo citoplasmatico ↓
<b>Estratto di Ginko-biloba</b>	Accumulo citoplasmatico ↓
<b>KPS-A</b>	Accumulo citoplasmatico ↓
<b>Triptolide</b>	Accumulo citoplasmatico ↓
<b>IL 1 β</b>	Accumulo citoplasmatico ↑
<b>TNF α</b>	Accumulo citoplasmatico ↑
<b>TGF β1</b>	Accumulo citoplasmatico ↑
<b>HPV</b>	Accumulo citoplasmatico ↑
<b>Alphavirus</b>	Accumulo citoplasmatico ↑
<b>ACTH</b>	Accumulo citoplasmatico ↑
<b>Androgeni</b>	Accumulo citoplasmatico ↑
<b>17-β Estradiolo</b>	Accumulo citoplasmatico ↑

### HuR e cancro

Fin dai primi anni '90, con la scoperta che le proteine della famiglia Hu erano associate al carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC), prese piede l'idea che queste RBPs potessero svolgere un ruolo importante nelle neoplasie (López de Silanes et al., 2005).

Nel corso degli ultimi decenni, la correlazione tra l'espressione di HuR e il cancro è divenuta sempre più forte. Ad esempio è stato visto che la regione in cui è sito il gene *HuR* è un locus associato a diverse traslocazioni e mutazioni oncogenetiche, come quelle che

coinvolgono il gene delle recettore delle cellule T, la dinamina 2 e le molecole di adesione cellulare (López de Silanes et al., 2005; Wang et al., 2013). In secondo luogo, attraverso un array composto da più di 300 coppie di tessuti sani e tumorali, si è osservato che HuR è over-espresso in quasi tutti i tessuti tumorali rispetto alla loro controparte sana (López de Silanes et al., 2003). Ulteriori studi hanno inoltre dimostrato che nei tumori a seno, colon, polmone ed ovaio, vi è una notevole correlazione tra i livelli di espressione di HuR e lo stato di progressione della neoplasia (López de Silanes et al., 2005). Ad esempio, in cellule di tumore mammario, la localizzazione citoplasmatica di HuR è solitamente associata ad una massa tumorale di maggiori dimensioni, a negatività per recettore degli estrogeni (ER), recettore del progesterone (PR), a positività per p53 e a classificazione del tumore come alto grado (Heinonen et al., 2007).

Studi svolti su linee cellulari immortalizzate hanno dimostrato che l'espressione di HuR è prevalentemente localizzata nel nucleo delle cellule tumorali e solamente un piccola percentuale si trova nel citoplasma. Analisi immunostochimiche hanno rivelato che la colorazione di HuR può essere citoplasmatica, nucleare o entrambe (Wang et al., 2013).

Considerato quanto descritto finora, la localizzazione cellulare e subcellulare di HuR sembra essere un surrogato della funzione di questa RBP nello sviluppo e nella progressione tumorale. Il meccanismo attraverso il quale HuR media la carcinogenesi non è ancora stato del tutto identificato; tuttavia tra i target identificati di HuR troviamo mRNA di geni coinvolti in tumorigenesi, proliferazione, angiogenesi, invasione e metastasi (Fig. 9).

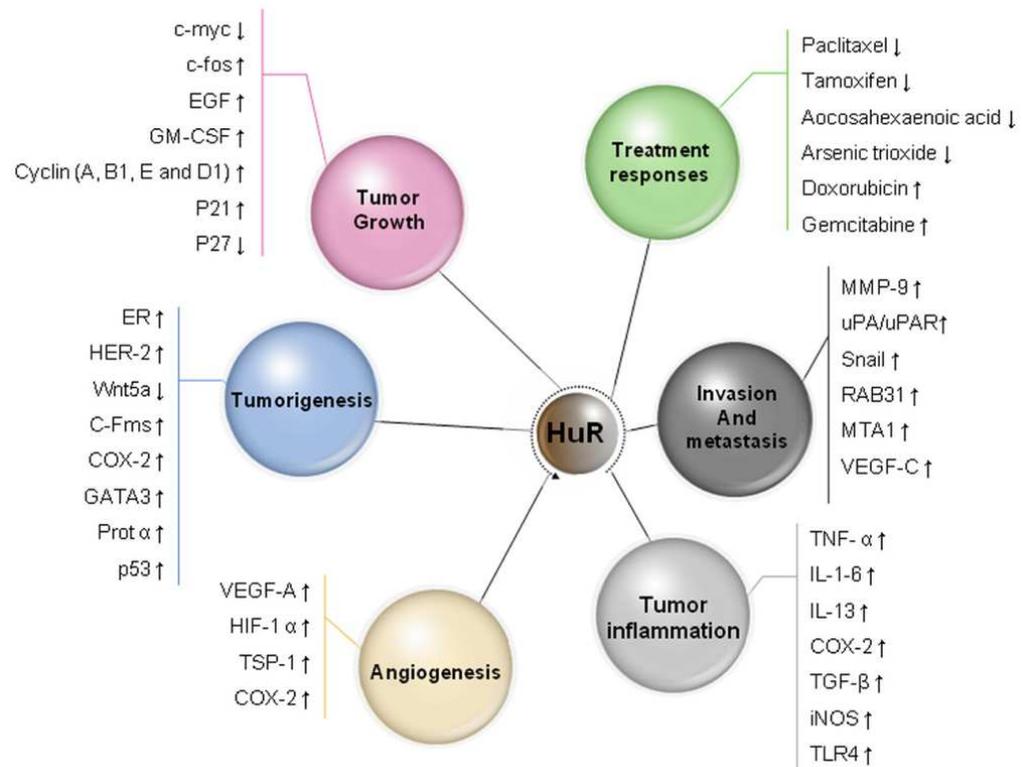


Figura 9. Le diverse funzioni di HuR nello sviluppo tumorale e nella sua progressione. EGF, epidermal growth factor; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; ER, estrogen receptor; COX-2, cyclooxygenase-2; GATA3, Trans-acting T-cell-specific transcription factor; ProT $\alpha$ , prothymosin  $\alpha$ ; VEGF, vascular endothelial growth factor; TSP1, thrombospondin 1; MMP-9, matrix metalloproteinase-9; uPA, urokinase-type plasminogen activator; uPAR, urokinase-type plasminogenactivator receptor; IL-6, interleukin-6; TNF- $\alpha$ , Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; IL-13, interleukin-13; TGF- $\beta$ , transforming growth factor- $\beta$ ; iNOS, inducible NO synthase; TLR-4, toll-like receptor-4 (Wang et al., 2013).

Uno dei principali tratti caratteristici delle cellule tumorali è la capacità di dividersi attivamente per permettere alla massa tumorale di crescere. Questa capacità è legata all'alterazione dei regolatori del ciclo cellulare. HuR è in grado di legare numerosi regolatori del ciclo cellulare ed in particolare le cicline D1, E, A2 e B1. Inoltre HuR lega l'mRNA di p27 a livello del 5'UTR reprimendone la traduzione (Wang et al., 2013).

Oltre a ciò, HuR promuove l'espressione di fattori che promuovono la proliferazione, come ad esempio l'*Epidermal growth factor (EGF)* e l'*Eukaryotic translation initiation factor (eIF4E)* (Abdelmohsen et al., 2010; Wang et al., 2013).

È noto che le cellule tumorali sono in grado di crescere anche in condizioni di stress. Tale caratteristica deriva dalla loro capacità di inibire gli effetti dei segnali pro-apoptotici. A conferma del coinvolgimento di HuR nella tumorigenesi, tra i suoi target possiamo trovare mRNA che codificano per fattori anti-apoptotici, come *Prothymosin α* (ProTα) che inibisce la formazione dell'apoptosoma, *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) che inibisce il rilascio del citocromo c dai mitocondri, *Myeloid cell leukemia 1* (Mcl-1), p21, Sirtuina 1 (SIRT1) che inibisce l'attività di proteine pro-apoptotiche come p53 e FOXO3a, Mdm2 e c-Myc (Abdelmohsen et al., 2010).

Un altro importante meccanismo alla base dello sviluppo e della progressione tumorale è l'angiogenesi, ovvero lo sviluppo di una vascolarizzazione locale che permetta a ossigeno e nutrienti di raggiungere la massa tumorale. Tra i target di HuR possiamo trovare anche fattori pro-angiogenici, così come anche fattori anti-angiogenetici la cui traduzione però risulta essere inibita dal legame con l'RBP. Tra questi target troviamo gli mRNA di geni come *Hypoxia-inducible factor α* (*HIF-1α*), coinvolto nei meccanismi di adattamento all'ipossia; *Vascular endothelial growth factor* (*VEGF*); *interleukin-8* (*IL-8*) ciclossigenasi-2 (*COX-2*), un enzima inducibile coinvolto nella sintesi delle prostaglandine, le quali risultano essere enormemente over-esprese nei tumori, e associato ad alti livelli di VEGF e all'angiogenesi (Abdelmohsen et al., 2010; Wang et al., 2013).

Le cellule tumorali si caratterizzano inoltre per la capacità di invadere i tessuti adiacenti e colonizzare sedi più distanti attraverso la formazione di metastasi. Tra i principali attori di questi meccanismi di invasività e migrazione tumorale troviamo fattori come Snail, responsabile della transizione epitelio-mesenchimale (EMT) attraverso la repressione dei fattori epiteliali quali l'E-caderina e le citocheratine e l'induzione delle proteine mesenchimali come fibronectina e metalloproteasi (Peinado et al., 2007). Le metalloproteasi sono proteine responsabili della digestione della matrice extracellulare e dei suoi componenti (collagene, laminina, fibronectina, proteoglicani). La metalloproteasi 9 (MMP9) risulta over espressa in molteplici tipi di cancro e tale over espressione è

associata ad elevati livelli di invasività e capacità metastatica (Deryugina et al., 2006). HuR è in grado di legare e stabilizzare gli mRNA di entrambi questi importanti fattori (Abdelmohsen et al., 2010).

## La tiroide

La tiroide è una ghiandola endocrina bilobata posta nella regione anteriore del collo, adiacente a laringe e trachea (Fig. 10).

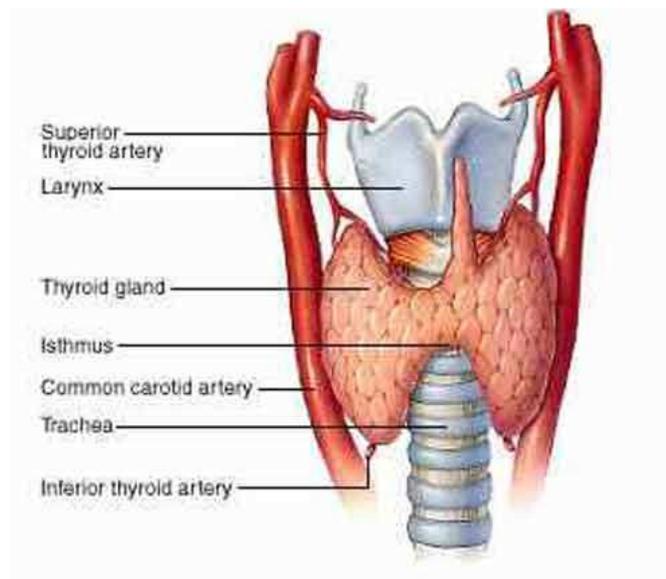


Figura 10. Localizzazione e struttura anatomica della ghiandola tiroide.

La tiroide si caratterizza per la sua forma a farfalla, le cui ali corrispondono ai due lobi laterali, posizionati ai lati della laringe e della trachea, lunghi circa 5 cm e larghi 2.5 cm, con un peso di circa 20-30 grammi. I due lobi che compongono la ghiandola tiroidea sono connessi medialmente tra loro dall'istmo che passa anteriormente alla trachea e dal quale spesso dipende un sottile prolungamento che si estende verso l'alto e che costituisce il lobo piramidale di Morgagni, un residuo del residuo del dotto tireoglossa che durante lo sviluppo fetale congiunge la tiroide alla lingua (Ross e Pawlina, 2010).

La tiroide è avvolta da una sottile capsula connettivale che mediante la guaina peritiroidea prende contatto con la laringe e la trachea oltre che coi fasci nervosi e vascolari della regione del collo. Tra la guaina peritiroidea e la capsula fibrosa esiste uno spazio in cui

decorrono i vasi. La ghiandola è irrorata dalle arterie tiroidee superiore (ramo della carotide esterna) e inferiore (ramo del tronco tireocervicale). Il ritorno venoso è invece a carico delle vene tiroidee superiore e media, tributarie della vena giugulare interna, e della vena tiroidea inferiore, che confluisce nelle vene brachioencefaliche (Martini et al., 2000).

Anteriormente e lateralmente la tiroide è ricoperta dai muscoli sottoioidei e sternocleidomastoidei che definiscono uno spazio anatomico chiamato loggia tiroidea.

La ghiandola tiroide, inoltre, è sita in prossimità di altre due importanti strutture: i nervi ricorrenti e le paratiroidi. I nervi ricorrenti o laringei inferiori innervano la maggior parte dei muscoli della laringe mentre le paratiroidi, generalmente presenti in numero di quattro, due superiori e due inferiori, sono piccoli organi endocrini deputati alla secrezione del paratormone.

Dalla capsula fibrosa che riveste esternamente la tiroide si originano sottili setti connettivali che si approfondano nel tessuto ghiandolare tiroideo, suddividendolo in lobuli e all'interno dei quali decorrono vasi ematici, linfatici e i nervi.

Lo sviluppo della ghiandola tiroide comincia durante la quarta settimana di gestazione a partire da un inspessimento dell'endoderma del pavimento della faringe primitiva. Tale abbozzo, crescendo caudalmente, va a formare un'invaginazione che viene definita dotto tireoglosso. Il dotto tireoglosso migra nel tessuto del collo fino al raggiungimento della sua corretta localizzazione, dove si divide nei due lobi. Durante tale migrazione solitamente il dotto tireoglosso si atrofizza e scompare; tuttavia, con una frequenza di circa il 40%, è possibile che il dotto permanga parzialmente, andando a formare il lobo piramidale. Nel corso della settima settimana, le cellule epiteliali che rivestono l'invaginazione della IV tasca branchiale, dette corpi ultimobranchiali, migrano verso la tiroide in formazione per poi fondersi con essa a formare le cellule parafollicolari. Infine, alla nona settimana di gestazione, le cellule di origine endodermica si differenziano in

cellule follicolari che si vanno a organizzare spazialmente formando i follicoli, le unità funzionali della tiroide (Ross e Pawlina, 2010).

I follicoli tiroidei sono delle strutture sferiche rivestite da epitelio follicolare cubico semplice che delimita la cavità follicolare, all'interno della quale è contenuta una sostanza omogenea e gelatinosa ad alta concentrazione proteica, detta colloide (Fig. 11).

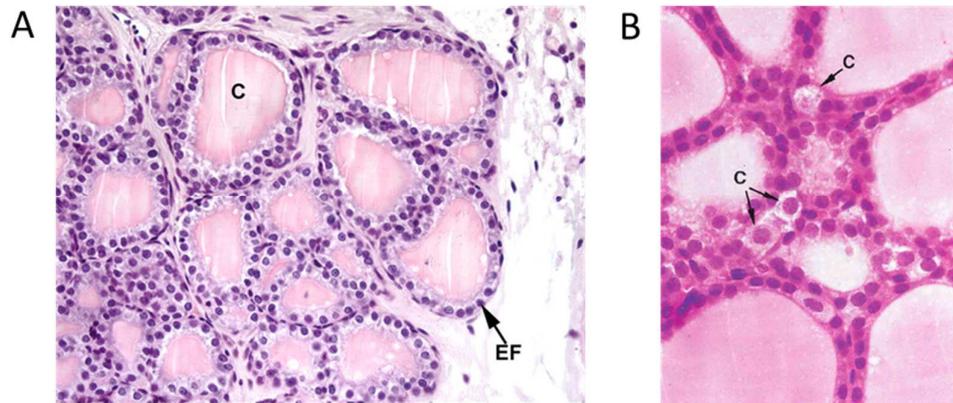


Figura 11. Sezioni istologiche di tiroide (E/E). Pannello A: La struttura follicolare (C: colloide; EF: epitelio follicolare) (<http://host.uniroma3.it>); Pannello B: Dettaglio delle cellule parafollicolari o cellule C (C: cellule C) (Atlante Waever).

L'intero parenchima tiroideo è costituito da centinaia di migliaia di follicoli di dimensioni variabili, con un diametro compreso tra 0.2 e 1 mm.

Come appena descritto, la ghiandola tiroide è composta principalmente dell'epitelio follicolare, che è costituito da due tipi di cellule: le cellule follicolari e le cellule parafollicolari. Le cellule follicolari sono deputate alla produzione degli ormoni tiroidei  $T_4$  (tiroxina o tetraiodotironina) e  $T_3$  (triiodotironina) e possono assumere una morfologia diversa a seconda dello stato funzionale della ghiandola. Più in particolare possono assumere una forma squamosa nella ghiandola inattiva o atrofica, cubica nella ghiandola normale o assumere una forma colonnare nella ghiandola in iperattività. Queste cellule poggiano basalmente sulla lamina basale, mentre la loro superficie apicale delimita il lume del follicolo ed è a contatto con la colloide. Dal polo luminale, la cui superficie è caratterizzata da numerosi microvilli, secernono nella cavità follicolare la tireoglobulina (Tg) mentre dal polo rivolto verso la lamina basale liberano l'ormone tiroideo nei capillari.

Come tutte le cellule che secernono attivamente sostanze proteiche sono particolarmente ricche in mitocondri e reticolo endoplasmatico rugoso (Molinaro et al., 1992; Ross e Pawlina, 2010).

Le cellule parafollicolari, chiamate anche cellule C, si trovano alla periferia dell'epitelio follicolare e, pur poggiando sulla membrana basale, non raggiungono il lume (Fig. 11B). Le cellule C non producono gli ormoni tiroidei, ma sono deputate della produzione dell'ormone calcitonina, responsabile del controllo della concentrazione ematica del calcio.

Attorno ai follicoli è presente un'estesa rete di capillari fenestrati che si originano dalle arterie tiroidee superiore e inferiore e all'interno dei quali vengono riversati gli ormoni tiroidei prodotti.

### Fisiologia della ghiandola tiroide

La tiroide svolge un ruolo fondamentale nella regolazione del metabolismo intermedio di tutti i tessuti ed è di estrema importanza per lo sviluppo del sistema nervoso centrale nel feto e nel neonato. Tali effetti si esplicano nella capacità della ghiandola di concentrare lo iodio rendendolo disponibile per la biosintesi degli ormoni tiroidei  $T_3$  e  $T_4$ , gli unici ormoni contenenti iodio nei vertebrati.

Come già detto la tiroide produce tre ormoni essenziali: la tiroxina ( $T_4$ ) e la triiodotironina ( $T_3$ ) e la calcitonina. Gli ormoni  $T_4$  e  $T_3$  vengono sintetizzati e secreti dalle cellule follicolari a partire dall'acido tirosina in risposta al rilascio dell'ormone TSH dall'adenoipofisi e sono responsabili delle regolazione del metabolismo basale delle cellule, della produzione di calore, della crescita e dello sviluppo.

La calcitonina viene sintetizzata dalle cellule parafollicolari ed è deputata alla riduzione dei livelli ematici di calcio attraverso l'inibizione dell'attività degli osteoclasti di riassorbimento osseo e la stimolazione della calcificazione dell'osteoida da parte degli osteoblasti. La secrezione della calcitonina è regolata direttamente dalla concentrazione di calcio nel sangue: alti livelli di calcio libero ne stimolano il rilascio, mentre basso livelli

di calcio lo inibiscono. Azione antagonista alla calcitonina è svolta invece dal paratormone, ormone secreto dalle ghiandole paratiroidi.

Come descritto in precedenza, il lume dei follicoli è colmo di colloide, la cui principale componente è la tireoglobulina (Tg), una glicoproteina inattiva estensivamente iodinata e contenente circa 120 residui di tirosina. La tireoglobulina non è un ormone, ma rappresenta il precursore inattivo degli ormoni tiroidei e viene utilizzato come riserva di  $T_3$  e  $T_4$  la cui forma attiva deriva dal processamento della Tg nelle cellule follicolari. La tiroide è l'unica ghiandola endocrina in grado di immagazzinare grandi quantità di precursore dell'ormone in depositi extracellulari.

La sintesi degli ormoni tiroidei  $T_3$  e  $T_4$  è un processo che si verifica nelle cellule follicolari attraverso molteplici passaggi (Fig. 12):

1. Sintesi della tireoglobulina a partire da un precursore che viene sintetizzato nel REr e quindi glicosilato nel Golgi per poi essere incorporato in vescicole secretorie e secreto per esocitosi nel lume del follicolo dove viene conservato ed immagazzinato;
2. Riassorbimento, diffusione e ossidazione dello iodio che viene trasportato attivamente sotto forma di ione ioduro ( $I^-$ ) dal sangue al citoplasma delle cellule follicolari attraverso trasportatori di iodio ATP-dipendenti. Lo iodio quindi diffonde nella regione apicale della cellula dove viene ossidato e poi rilasciato nella colloide;
3. Iodinazione della tireoglobulina a livello dei residui di tirosina attraverso un processo detto di organizzazione dello iodio per azione della perossidasi tiroidea che aggiunge un primo atomo di iodio ad una singola tirosina (formando la monoiodotirosina, MIT). L'eventuale aggiunta di un secondo atomo di iodio porta alla formazione della diiodotirosina (DIT).
4. Sintesi degli ormoni  $T_3$  e  $T_4$  dall'ossidazione di due residui di tirosina iodinata adiacenti. Dall'accoppiamento di un residuo di MIT e uno di DIT si ottiene

l'ormone  $T_3$ , mentre l'accoppiamento di due residui DIT produce il  $T_4$ . Gli ormoni così prodotti rimangono immagazzinati nella colloide;

5. Riassorbimento della tireoglobulina della colloide in risposta all'ormone tireotropo TSH da parte delle cellule follicolari tramite endocitosi recettore-mediata. Le vescicole di colloide endocitate migrano verso la regione basale della cellula dove si fondono con i lisosomi all'interno dei quali le proteasi lisosomiali degradano la tireoglobulina in aminoacidi e carboidrati, liberando del molecole di DIT, MIT,  $T_3$  e  $T_4$ ;
6. Rilascio di  $T_3$  e  $T_4$  in circolo per diffusione nei capillari sanguigni e linfatici dove il 70% degli ormoni vengono immediatamente complessato dalla proteina sierica TBP (*thyroxin-binding protein*), il 25% circa dall'albumina e il restante 5% rimane libero e quindi metabolicamente attivo. La produzione di  $T_3$  e  $T_4$  non avviene nella stessa quantità, ma in rapporto di 1:20 poiché la produzione dell'ormone  $T_4$  è esclusiva della tiroide, mentre la maggior parte del  $T_3$  viene prodotto, per conversione del  $T_4$ , in altri organi come reni, fegato e cuore.

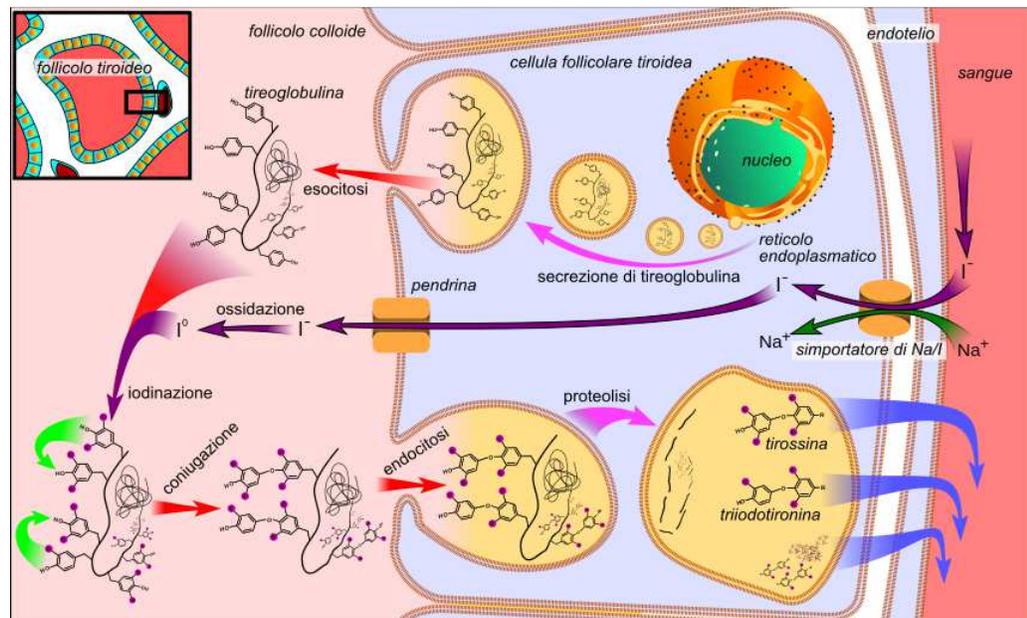


Figura 12. Rappresentazione schematica della produzione degli ormoni tiroidei (Walter et al., 2003).

## I tumori tiroidei

Il cancro alla tiroide rappresenta la neoplasia endocrina maligna più comune. Tuttavia è una condizione rara, costituisce infatti solamente l'1% circa di tutti i tumori umani (Carlomagno and Santoro, 2011). Per ragioni non ancora ben chiarite risulta essere circa 3-4 volte più frequente nelle donne rispetto agli uomini (Brown *et al.*, 2011). In Italia l'incidenza, ossia il numero di nuovo casi per anno, è di 4,1 casi ogni 100.000 abitanti per gli uomini e 12,5 nuovi casi ogni 100.000 abitanti per le donne ([www.airc.it](http://www.airc.it)). L'incidenza risulta essere massima tra i 25 e i 65 anni; per quanto il tumore possa presentarsi in tutte le fasce d'età risulta essere estremamente raro al di sotto dei 16 anni.

### I tipi di tumori tiroidei

Il sintomo più frequente di tumore tiroideo è dato dalla presenza di noduli o tumefazioni a livello della ghiandola. Non tutti i noduli tiroidei nascondono però forme di cancro, anzi: spesso sono il segno di iperplasia tiroidea, ovvero una forma benigna di crescita ghiandolare. Nella maggior parte dei casi si tratta infatti di lesioni benigne che solo raramente sono sintomatiche; si stima che meno del 5% dei noduli tiroidei nasconda effettivamente un tumore. Solo in una minoranza di pazienti si instaura infatti un quadro sintomatologico tipico della tireotossicosi (eccesso di ormoni tiroidei) o la crescita dei noduli a tal punto da creare problemi di fonazione o deglutizione.

Il cancro alla tiroide può originare sia dalle cellule follicolari che dalle cellule non-follicolari. A seconda del tipo cellulare da cui ha origine la neoplasia possiamo classificarla in diverse tipologie di cancro. I carcinomi che originano dalle cellule follicolari includono: il carcinoma follicolare (FTC, 15%) e il carcinoma papillifero (PTC, 80%), che costituiscono nell'insieme la grande maggioranza dei tumori tiroidei sono definiti carcinomi differenziati, il cancro a cellule di Hürthle (HCC, 3%) e il carcinoma anaplastico (ATC, 2%), definito anche come indifferenziato.

Il cancro a cellule di Hürthle è un sottotipo di carcinoma follicolare che però viene spesso classificato come a se stante dal momento che ha un aspetto istologico caratteristico e spesso, a differenza degli altri FTCs, è scarsamente responsivo alla terapia standard.

Dalle cellule tiroidee parafollicolari, invece, si origina il carcinoma midollare (MTC) (Brown *et al.*, 2011).

Il carcinoma papillifero è il tumore tiroideo più frequente e caratterizzato dalla prognosi migliore, soprattutto se al momento della diagnosi non vi è presenza di metastasi. Solo occasionalmente i PTCs possono dedifferenziare in tumori più aggressivi e letali.

Dal punto di vista istologico, il PTC è spesso privo di capsula e nonostante tipicamente la lesione tenda a rimanere localizzata, col tempo può diffondersi attraverso le vie linfatiche metastatizzando preferenzialmente a livello di linfonodi cervicali e sovra-mediastinici.

Il PTC è un tumore di origine epiteliale in cui le cellule neoplastiche tendono a crescere raccolte attorno al nucleo fibrovascolare, formando strutture follicolari e papillifere (Fig. 13). Un'altra peculiarità riguarda la presenza di anomalie nucleari nelle cellule tumorali: nel 20% dei soggetti affetti sono osservabili foci multipli distribuiti nel parenchima ghiandolare.

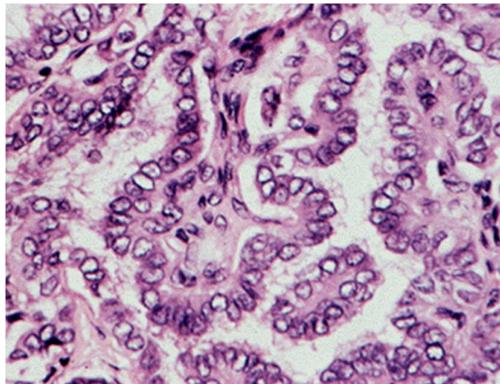


Figura 13. Sezione istologica di carcinoma papillifero tiroideo (E/E) (<http://www.pathologyoutlines.com>).

I PTCs comprendono anche diversi sottotipi di tumore papillifero, tra cui la variante follicolare (FV), caratterizzata da un pattern di crescita follicolare predominante.

Il carcinoma follicolare rappresenta il 5-15% dei tumori tiroidei e risulta essere più diffuso nelle regioni in cui l'apporto di iodio con la dieta è insufficiente. Al pari del carcinoma papillifero origina dalle cellule epiteliali tiroidee.

La lesione può essere o meno circondata da una capsula, che comunque può essere facilmente invasa dalle cellule cancerose che poi metastatizzano per via ematica in distretti lontani quali ossa e polmoni. Per questa sua caratteristica di diffondere per via ematica generando metastasi a distanza, l'FTC viene considerato più aggressivo del PTC. Istologicamente la neoplasia si caratterizza per la presenza di strutture follicolari ben definite; in altri casi le cellule si dispongono invece in lamine solide (Fig. 14). Di norma si tratta di noduli solitari di dimensioni superiori rispetto a quelli di tipo papillifero.

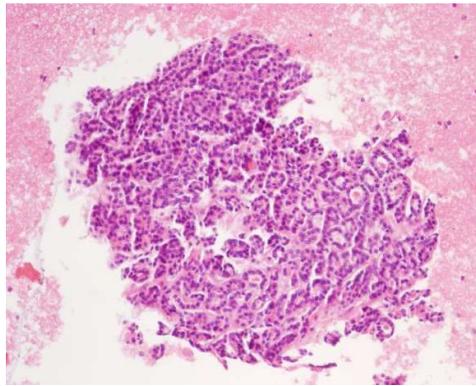
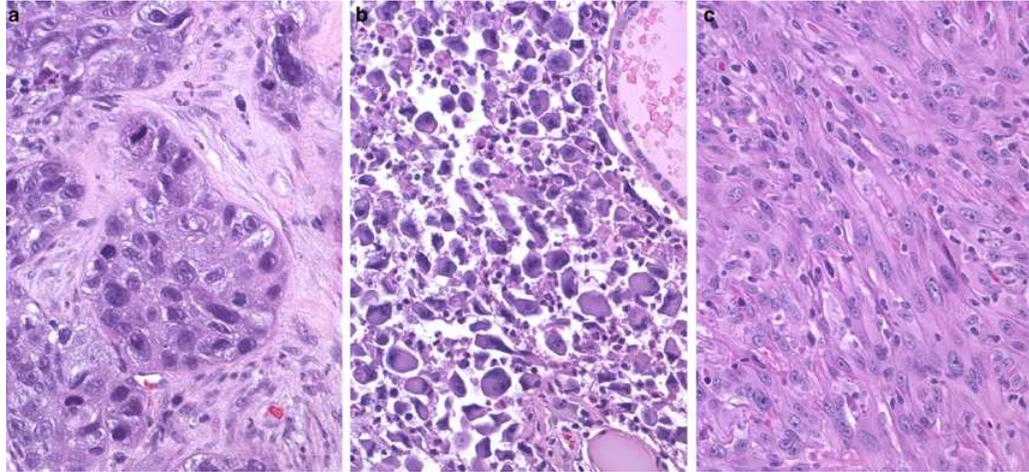


Figura 14. Sezione istologica di carcinoma tiroideo follicolare (<http://www.aipvet.it>).

Il carcinoma anaplastico è un tumore molto raro e costituisce meno del 5% dei tumori tiroidei. Risulta essere più frequente nei soggetti anziani (oltre i 60 anni) con leggera prevalenza nella popolazione di sesso femminile. E' l'istotipo caratterizzato dal maggiore grado di aggressività e di mortalità; portando al decesso del paziente non oltre un anno dopo la diagnosi.

La storia clinica tipica degli ATCs è rappresentata da un rapidissimo incremento di una tumefazione del collo con invasione delle strutture anatomiche limitrofe (trachea, esofago, mediastino), causando difficoltà nella deglutizione e nella respirazione.

Come si può dedurre dalla denominazione stessa del tumore, le cellule tumorali dell'ATC hanno perso parzialmente o completamente il fenotipo differenziato. A livello istologico il tumore risulta essere estremamente variabile con la presenza di cellule fusiformi miste e cellule giganti (Fig.15).



*Figura 15. Sezioni istologiche di carcinoma tiroideo anaplastico. A livello microscopico gli ATCs appaiono altamente variabili. Frequentemente si riscontra la presenza di tessuto squamoido (a), cellule giganti (b) e cellule fusiformi (c) ([http://www.nature.com/modpathol/journal/v17/n11/fig\\_tab/3800198f1.html](http://www.nature.com/modpathol/journal/v17/n11/fig_tab/3800198f1.html)).*

Il carcinoma midollare rappresenta circa il 5% dei tumori tiroidei e deriva dalle cellule parafollicolari o cellule C calcitonina-secernenti (Fig. 16). Poiché le cellule C neoplastiche secernono una maggiore quantità di calcitonina, il dosaggio di questo ormone costituisce un vero e proprio marker tumorale.

Il tumore si manifesta sotto forma sporadica (80%), ma nel 20% dei casi gli si riconosce un'origine di tipo ereditaria.

L'MTC ad insorgenza sporadica si manifesta generalmente con un nodulo tiroideo associato a metastasi linfonodali nella regione del collo e con alti livelli di calcitonina.

La forma ereditaria di MTC si trasmette come carattere autosomico dominante ed è causata da mutazioni germinali del protooncogene RET, situato sul braccio lungo del cromosoma 10, codificante per un recettore tirosin-chinasico. Lo sviluppo di carcinoma

midollare tiroideo familiare (FMTC) può manifestarsi singolarmente o nell'ambito della sindrome endocrina multipla di tipo 2 (MEN2).

La prognosi varia a seconda che si tratti di tumore sporadico o familiare. In generale si tratta di un tumore scarsamente differenziato e quindi con aggressività maggiore rispetto ai tumori differenziati. La prognosi è peggiore in caso di presenza di metastasi che possono diffondersi sia per via ematica che linfatica.

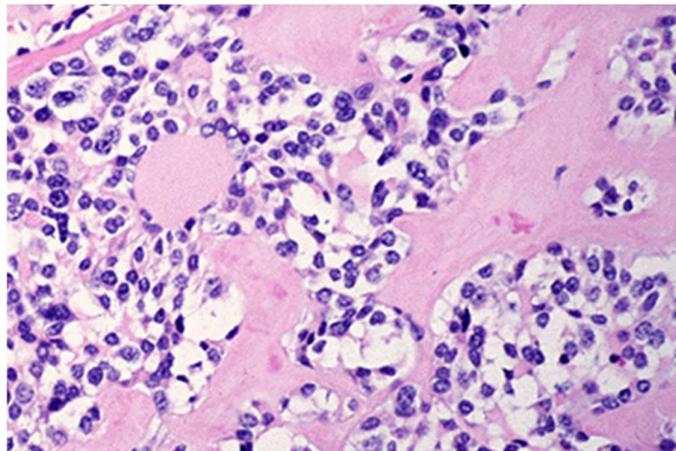


Figura 16. Sezione istologica di carcinoma midollare della tiroide (MTC)(E/E) (<http://pathologyoutlines.com/topic/thyroidmedullary.html>).

### La genetica dei tumori tiroidei

Negli ultimi anni, attraverso numerosi studi genetici, è stato possibile ottenere un gran numero di informazioni sui meccanismi molecolari coinvolti nella patogenesi delle neoplasie tiroidee. È stato quindi possibile identificare alcune mutazioni geniche che si associano ai tumori tiroidei.

Nei PTCs sono state identificate una serie di alterazioni somatiche ad alta frequenza (70%) di geni che codificano per effettori della via di segnalazione della *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), tra le quali troviamo mutazioni puntiformi dei geni di *BRAF* e *RAS*, fusioni cromosomiche che coinvolgono il gene *RET* e *NTRK1* (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2015).

A queste mutazioni tipiche dei PTCs, si aggiungono anche il riarrangiamento *PAX8/PPAR gamma*, associato agli FTCs, la mutazione di *RAS*, associata a PTCs e FTCs; la mutazione di *RET*, associata agli MTCs (Tab. 3).

Tabella 3. Alterazioni genetiche associate a tumore tiroideo non familiare derivato da cellule follicolari (Lebastchi et al., 2014).

Genetic alterations	Associated thyroid malignancy	Frequency
BRAF mutation	Papillary thyroid carcinoma	29%-69%
	Anaplastic thyroid carcinoma	0%-12%
RET/PTC rearrangements*	Papillary thyroid carcinoma	13%-25%
	Papillary thyroid carcinoma	5%-13%
TRK rearrangements	Papillary thyroid carcinoma	0%-21%
Ras mutation	Follicular thyroid carcinoma	40%-53%
	Anaplastic thyroid carcinoma	20%-60%
PAX8-PPAR- $\gamma$	Follicular thyroid carcinoma	35%-45%
CTNNB1 mutation	Anaplastic thyroid carcinoma	66%
p53 mutation	Papillary thyroid carcinoma	0%-5%
	Follicular thyroid carcinoma	0%-9%
	Anaplastic thyroid carcinoma	67%-88%

CTNNB1,  $\beta$ -catenin; PPAR- $\gamma$ , peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ ; TRK, tyrosine kinase receptor.

\* Papillary thyroid carcinoma specific.

Le mutazioni puntiformi del gene *BRAF*, una serina-treonina-chinasi appartenente alla famiglia delle proteine RAF, effettori intracellulari della cascata di segnalazione di MAPK, costituiscono la forma più comune di alterazione genica nei tumori tiroidei papilliferi, presenti nel 40% circa dei casi. La mutazione più frequente del gene *BRAF* coinvolge il nucleotide 1799 del gene e determina una sostituzione del residuo 600 da valina a glutammato (V600E) che induce l'attivazione costituzionale di BRAF.

La mutazione *BRAF*<sup>V600E</sup> è tipica dei PTCs con istologia classica, mentre è più rara in quelli con variazione in FTC. Questa mutazione può essere inoltre identificata anche in qualche caso di ATC. Poiché la mutazione *BRAF*<sup>V600E</sup> non è stata mai individuata in FTC e noduli benigni, tale mutazione può essere considerata come un marker specifico di PTC (Xing, 2005). *BRAF*<sup>V600E</sup> può essere inoltre considerato un marker prognostico nei PTCs poiché risulta essere associato a caratteristiche tumorali più aggressive, come estensione extratiroidea, metastasi ai linfonodi e a distanza e stadiazione di classe III e IV (Xing, 2007). La famiglia di geni umani *RAS* include i geni *HRAS*, *KRAS*, e *NRAS*. Questi codificano per proteine G altamente correlate che si trovano sulla superficie interna della membrana

cellulare e propagano i segnali derivanti dai recettori membrana tirosin-chinasici delle vie di segnale di MAPK, PI3K/AKT e altre vie di segnalazione (Nikiforov, 2011). Mutazioni puntiformi attivatorie a livello dei domini discreti dei geni *RAS* (codoni 12/13 e 61) sono comuni in diversi tipi di tumori umani. Mentre nella maggior parte dei tipi di cancro predominano le mutazioni a livello dei codoni 12/13 di *KRAS*, nella tiroide le mutazioni più frequenti riguardano il codone 61 di *NRAS* e *HRAS*. Queste mutazioni sono altamente prevalenti in FTC (40-50%) e nella variante follicolare del cancro alla tiroide papillare (20%) e raramente rilevati nella variante classica del cancro papillare della tiroide (10 %) (Ezzat et al., 1996; Motoi et al., 2000). Alcune mutazioni dei geni *RAS* sono state identificate anche in noduli tiroidei benigni (tra il 20 e il 40 %) e in adenomi follicolari (FA) benigni; tuttavia non è ancora chiaro se gli FA *RAS*-positivi abbiano o meno una maggiore probabilità di generare un carcinoma (Nikiforova et al., 2003). Data quindi la prevalenza complessivamente bassa di mutazioni di *RAS* nei tumori tiroidei e il tasso relativamente elevato di mutazioni in lesioni benigne, l'analisi delle mutazioni dei geni *RAS* risulta essere inadatta come test indipendente per predire la malignità in noduli tiroidei.

La *BRAF<sup>V600E</sup>* e le mutazioni di *RAS* sono considerate *driver-mutation*, mutazioni guida, mutualmente esclusive dei PTCs, con distinte conseguenze molecolari. Ad esempio i tumori determinati dalla mutazione *BRAF<sup>V600E</sup>* non rispondono al feedback negativo di ERK su *RAF*, con il conseguente incremento del *signaling* di MAPK. Viceversa, nei tumori determinati da una mutazione di *RAS* si ha la formazione di dimeri di *RAS* che rispondono al feedback di ERK, con una riduzione del *signaling* di MAPK (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2015). Queste diverse conseguenze sulla segnalazione cellulare influiscono anche sullo sviluppo di differenze fenotipiche tra i PTCs. Ad esempio, l'espressione di geni responsabili della captazione dello iodio e del metabolismo sono notevolmente ridotti nei tumori con *BRAF<sup>V600E</sup>*, mentre nei tumori con i dimeri di *RAS* l'espressione di questi geni viene largamente preservata (Durante et al., 2007).

A queste mutazioni tipiche dei PTCs, grazie allo studio della rete di ricerca del “The Cancer Genome Atlas”, è stato possibile identificare nuove *driver-mutations* in questo tipo di tumore, come ad esempio la mutazione di *EIF1AX*, e nuove alterazioni di geni già noti, come *RET*, *BRAF* e *ALK* (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2015).

Il proto-oncogene *RET* codifica per un recettore di membrana tirosin-chinasico altamente espresso nelle cellule C, ma non nelle cellule follicolari, dove risulta essere attivato solamente nel caso in cui ci sia il riarrangiamento cromosomico con formazione di *RET/PTC*, dove la porzione codificante di *RET* viene fusa con vari altri geni non relati e poiché le proteine di fusione contengono il dominio tirosi-chinasico di *RET* sono in grado di attivare la via di segnale di *MAPK* (Fusco et al., 1987.; Jhiang et al., 1996). Ad oggi sono stati identificati fino a undici riarrangiamenti *RET/PTC*, due dei quali (*RET/PTC1*, formato dalla fusione di *RET* con *CCDC6* e *RET/PTC3*, dalla fusione di *RET* con *NCOA4*) sono i più frequenti nei PTCs (Grieco et al., 1990). Il riarrangiamento *RET/PTC1* è associato a tumori istologicamente ben differenziati e ad una migliore prognosi (Adeniran et al., 2006), mentre *RET/PTC3* è associato a tipi di tumori più aggressivi (Basolo et al., 2002). Tuttavia, poiché la frequenza di questa mutazione nei PTC va dal 5 al 35%, non è possibile utilizzarla come marker diagnostico unico per i PTCs (Xavier et al., 2013).

Il riarrangiamento *PAX8/PPAR gamma* è il risultato della traslocazione t(2;3)(q13;p25) che porta alla fusione tra il gene *PAX8*, che codifica per un fattore di trascrizione e il gene del recettore *PPAR gamma* (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) con conseguente over-espressione della proteina *PPAR-gamma*. Questo riarrangiamento è stato identificato nel 30-40% dei carcinomi follicolari ed è associato a insorgenza precoce, dimensioni ridotte della lesione neoplastica, ma con una maggior frequenza di invasione vascolare. Il riarrangiamento *PAX8/PPAR gamma* è stato riscontrato anche in una piccola percentuale di carcinomi papilliferi con variante follicolare e in adenomi follicolari. Poiché gli FA che risultano positivi a questo riarrangiamento a livello immunohistochimico hanno

un profilo tipicamente tumorale, si pensa che questi possano essere in realtà delle lesioni maligne ad uno stadio precoce.

Il proto-oncogene *RET* codifica per un recettore tirosin-chinasico responsabile della trasduzione dei segnali per la regolazione della crescita cellulare e la sopravvivenza che risultano essere de-regolarizzati in presenza di mutazioni germinali del gene *RET*. Le mutazioni del gene *RET* sono date dalla sostituzione di singoli nucleotidi che portano all'attivazione costitutiva del recettore. Tali mutazioni risultano essere associate al carcinoma midollare della tiroide (MTC) in forma familiare, ma in qualche caso possono essere presenti anche nelle forme sporadiche (Nikiforov, 2011).

### La diagnosi

La maggior parte dei tumori tiroidei è asintomatica e spesso la scoperta del tumore avviene casualmente durante l'esecuzione di esami tesi ad accertare l'eventuale presenza di altre patologie (TAC, RMN, etc.). In altri casi, invece, il paziente si accorge della presenza di un nodulo nella regione anteriore del collo che si muove con i movimenti della deglutizione, mentre, se la lesione è di dimensioni notevoli il paziente può già accusare disturbi alla respirazione e alla deglutizione.

I noduli alla tiroide rappresentano un'entità clinica piuttosto comune. Infatti 'nodulo' è un termine generico e che può rappresentare la manifestazione di un ampio spettro di patologie differenti, quali iperplasia ghiandolare spontanea o conseguente a tiroidectomia parziale, tiroidite cronica autoimmune di Hashimoto, infiltrazione linfocitaria, cisti o di lesioni focali di tipo benigno e solo in una minoranza di casi (3-5%) il nodulo è di carattere maligno. I noduli benigni presentano generalmente un'architettura ordinata con poche mitosi e assenza di invasione linfatica o ematica. Sono di norma circondati da una capsula fibrosa.

La prima valutazione del medico consiste in un esame obiettivo della regione del collo dalla quale può sorgere un sospetto di malignità in seguito alla presenza di uno o più tra i seguenti sintomi e segni: consistenza elevata, margini irregolari, mobilità scarsa rispetto

alle strutture adiacenti, disfonia, disfagia, dispnea e linfadenomegalie in sede latero-cervicale.

Tuttavia l'esame obiettivo non consente di discriminare tra lesioni benigne e maligne, pertanto, una volta accertata la presenza di noduli tiroidei, si procede a:

- Valutazione della disfunzione della ghiandola mediante dosaggio dei livelli circolanti di TSH, ormoni T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub> liberi e calcitonina. Tuttavia questo tipo di indagine non sempre risulta essere informativa, poiché tipicamente i valori del TSH e degli ormoni tiroidei, in presenza di tumore, sono comunque nella norma.
- Ecografia tiroidea, che permette di valutare sia le dimensioni che le caratteristiche strutturali dei noduli, come la presenza della capsula, di microcalcificazioni, vascolarizzazione intra-nodulare e irregolarità dei margini.
- Scintigrafia tiroidea, la quale fornisce informazioni circa la funzionalità della ghiandola e dei noduli attraverso la somministrazione di un tracciante radioattivo (99mTc-pertecnetato) che viene captato solamente dalle cellule tiroidee. La scintigrafia tiroidea consente di distinguere tra noduli "caldi" o "freddi" a seconda della loro capacità di captare e concentrare lo radioiodio rispetto al parenchima circostante. I noduli "freddi" rappresentano l'80% dei noduli tiroidei. Per quanto non siano sinonimo di neoplasia maligna in alcune casistiche l'incidenza di carcinoma in queste lesioni raggiunge il 25%. I noduli caldi rappresentano fino al 20% dei noduli tiroidei, sono più frequenti nelle aree a carenza iodica e sono maligni solo in rarissimi casi.
- Agoaspirato (FNA, *fine needle aspiration*), che è l'unico strumento che consente di effettuare diagnosi certa attraverso la raccolta di un campione di cellule che viene sottoposto ad esame citologico.

Sulla base dei dati ottenuti, sulle dimensioni e l'estensione delle lesioni è possibile effettuare la stadiazione del tumore, ovvero è possibile definire un parametro che indica

quanto è grande il tumore e qual è la sua diffusione e che permette la scelta del trattamento più idoneo.

Per definire lo stadio dei tumori tiroidei esistono due diversi sistemi: il numerico e il sistema TNM.

Il sistema numerico classifica i tumori in quattro stadi:

- Stadio I: tumore di piccole dimensioni e circoscritto;
- Stadi II o III: invasione neoplastica dei linfonodi adiacenti;
- Stadio IV: diffusione neoplastica ad altri organi.

Nei carcinomi differenziati (del tipo papillifero e follicolare), nella definizione dell'aggressività del tumore e della prognosi, particolare importanza viene ricoperta dall'età del paziente all'epoca della diagnosi. Per questi due tipi di tumore pertanto viene utilizzata una seconda classificazione numerica in base all'età del soggetto ([www.aimac.it](http://www.aimac.it)):

- età inferiore a 45 anni:
  - stadio 1: il tumore, indipendentemente dalle dimensioni, può avere invaso i linfonodi adiacenti, ma non si è diffuso ad altri organi;
  - stadio 2: il tumore, indipendentemente dalle dimensioni, si è diffuso ad altri organi (ad esempio ossa o polmone);
- età pari o superiore a 45 anni:
  - stadio 1: il tumore ha un diametro massimo di 2 cm ed è confinato alla tiroide;
  - stadio 2: il tumore ha un diametro compreso tra 2 e 4 cm ed è confinato alla tiroide;
  - stadio 3: il tumore ha un diametro superiore a 4 cm ed è confinato alla tiroide; oppure, il tumore, indipendentemente dalle dimensioni, ha iniziato a diffondersi oltre la tiroide o ha invaso i linfonodi adiacenti;

- stadio 4A: il tumore, indipendentemente dalle dimensioni, ha invaso i tessuti adiacenti del collo (ad esempio, i muscoli, i nervi o i vasi sanguigni) e/o i linfonodi del collo o della parte superiore del torace;
- stadio 4B: il tumore, indipendentemente dalle dimensioni, ha invaso i tessuti del collo in prossimità della colonna vertebrale o della parte superiore del collo o del torace. Il tumore può avere invaso anche i linfonodi;
- stadio 4C: il tumore si è diffuso ad altri organi, (ad esempio, ossa o polmone).

Il secondo metodo di stadiazione dei tumori tiroidei è il sistema introdotto dall'American Joint Committee on Cancer (AJCC), ovvero il sistema TNM. Il sistema TNM si basa su tre parametri chiave: T, che indica le dimensioni del tumore e comprende quattro stadi, T1 – T4;

N, che indica se nei linfonodi adiacenti alla tiroide sono presenti cellule tumorali e comprende i due stadi N0 (linfonodi non sono presenti cellule tumorali) e N1 (nei linfonodi sono presenti cellule tumorali); M che indica se sono presenti metastasi in altri organi e comprende i due stadi M0 (non sono presenti metastasi) e M1 (sono presenti metastasi). Associando gli stadi T, N e M è poi possibile definire la stadiazione complessiva della malattia (Lebastchi e Callender, 2014) (Tab. 4):

Tabella 4. Stadiazione TNM dei tumori tiroidei secondo l'American Joint Committee on Cancer

AJCC TNM staging for thyroid cancer.

---

<i>T staging</i>	
TX	Primary tumor cannot be assessed
T0	No evidence of primary tumor
T1	Tumor ≤ 2 cm in greatest dimension limited to the thyroid
T2	Tumor 2-4 cm limited to the thyroid
T3	Tumor > 4 cm limited to the thyroid, or any tumor with minimal extrathyroid extension (eg, extension to sternothyroid muscle or perithyroidal soft tissues)
T4a	Tumor of any size extending beyond the thyroid capsule to invade subcutaneous soft tissues, larynx, trachea, esophagus, or recurrent laryngeal nerve
T4b	Tumor invades prevertebral fascia or encases carotid artery or mediastinal vessels
<i>N staging</i>	
NX	Regional lymph nodes cannot be assessed
N0	No regional lymph node metastasis
N1	Regional lymph node metastasis (central compartment, lateral cervical, or upper mediastinal)
N1a	Metastasis to level VI lymph nodes (pretracheal, paratracheal, and prelaryngeal or Delphian lymph nodes)
N1b	Metastasis to unilateral, bilateral, or contralateral cervical or upper mediastinal lymph nodes
<i>M staging</i>	
MX	Distant metastasis cannot be assessed
M0	No distant metastasis
M1	Distant metastasis

---

## Prognosi e terapia

I carcinomi tiroidei papillifero e follicolare, definiti tumori differenziati, sono le tipologie di tumore meno aggressive e hanno in generale un'ottima prognosi, infatti, più del 90% dei pazienti sopravvive a 10 anni dalla diagnosi.

Il trattamento previsto per il tumore tiroideo comprende un intervento chirurgico di tiroidectomia totale; la somministrazione post-operatoria di iodio radioattivo; la terapia ormonale (Brown *et al.*, 2011).

Gli interventi chirurgici a cui può venire sottoposto il soggetto con cancro tiroideo possono prevedere una lobectomia, ovvero la rimozione del singolo lobo tiroideo nel quale viene riscontrata la presenza del cancro; una tiroidectomia totale o una linfadenectomia, ovvero la rimozione di tutti i linfonodi presenti a livello del collo e che contengono cellule cancerose. È un'opzione terapeutica applicabile a tumori poco aggressivi (o una cosa del genere), questo poiché, nel 95% dei casi di carcinoma anaplastico, al momento della diagnosi, il tumore ha già invaso la capsula e i tessuti circostanti e pertanto l'intervento

chirurgico di resezione serve a ridurre la compressione delle strutture circostanti quali la trachea, ma non ha intenti curativi.

La radioterapia post-operatoria con iodio radioattivo (RAI) viene effettuata al fine di distruggere le cellule tiroidee residue, sia normali che tumorali, incluse quelle che sono migrate in altre sedi dell'organismo.

La terapia ormonale prevede la somministrazione di levo-tiroxina (L-T4) che permette di mantenere bassi i livelli di TSH il quale che ha un effetto stimolatorio nei confronti della crescita neoplastica. Tuttavia tale approccio non può essere utilizzato per i carcinomi indifferenziati e midollari che non sono TSH-dipendenti e quindi non ricavano benefici da questo tipo di trattamento ad eccezione della correzione dell'ipotiroidismo post-operatorio.

Nel 10-15% di pazienti con carcinoma tiroideo differenziato si sviluppano metastasi a distanza, per lo più a livello di polmone (50-60%) e ossa (20-30%) mentre più rare sono quelle a livello di fegato, cervello e cute.

L'intervento chirurgico può però in alcuni casi non curare ma bensì prevenire o ritardare la comparsa di sintomi come quelli prodotti dalle metastasi ossee. I pazienti con metastasi a distanza possono trarre benefici da trattamenti ripetuti con radioiodio. Quando questo non è più efficace e la rimozione chirurgica non è realizzabile, si opta per la radioterapia esterna o la chemioterapia.

Ad eccezione del carcinoma anaplastico, il cui decorso è fortemente aggressivo e la sopravvivenza dalla diagnosi è inferiore all'anno, le neoplasie maligne della tiroide hanno nella maggior parte dei casi decorso indolente e la prognosi, benché peggiori con l'aumentare dell'età alla diagnosi, è generalmente favorevole. I soggetti di età inferiore ai 45 anni sono quelli che hanno in assoluto una prognosi migliore: la sopravvivenza a 5 anni è del 99%. Essa si riduce al 49% nei pazienti oltre i 75 anni.

Negli ultimi anni sono emersi nuovi agenti terapeutici per il trattamento del cancro alla tiroide, in particolare dei tumori differenziati non responsivi ai trattamenti standard. Il

razionale di questi agenti risiede nel fatto che hanno come bersaglio le aberrazioni note presenti nel carcinoma tiroideo descritte in precedenza. Un altro bersaglio estremamente attraente nel trattamento dei tumori in generale è rappresentato dal fenomeno dell'angiogenesi, per combattere il quale sono stati sviluppati diversi inibitori del VEGF.

Tra i farmaci ad oggi approvati dalla Food and Drug Administration (FDA) per il trattamento chemioterapico della carcinoma tiroideo troviamo il Caprelsa (Vandetanib), il Cometriq (Cabozantinib-S-Malate), il Doxorubicin Hydrochloride, il Lenvima (Lenvatinib Mesylate) e il Nexavar (Sorafenib Tosylate).

A questi farmaci già approvati si aggiungono anche numerosi nuovi composti che attualmente sono ancora in fase di trials clinici. Tra questi troviamo ad esempio la rapamicina, un inibitore di mTOR, una serina/tronina chinasi che attraverso la fosforilazione regola la sintesi proteica, il metabolismo, la crescita e la sopravvivenza cellulare e che costituisce l'effettore finale della via di segnalazione di PI3K/Akt. eiF4E è il fattore iniziale della via di PI3K/Akt, e risulta essere overespresso nei PTCs e negli MTCs. L'inibizione di mTOR porta alla riduzione della crescita e della vitalità cellulare *in vitro* (Fallahi et al., 2015). Attualmente sono in corso trials clinici di fase I su pazienti affetti da PTC o MTC.

Un'altra classe di farmaci attualmente in studio per il trattamento del tumore tiroideo è quella dei farmaci epigenetici, ed in particolare degli inibitori delle deacetilasi istoniche.

Il SAHA (suberoylanide hydroxamic acid o Vorinostat), già approvato dall'FDA per il trattamento del linfoma cutaneo a cellule T, è in grado di arrestare la crescita delle cellule tumorali tiroidee e di indurre l'apoptosi *in vitro* (Luong et al., 2006).

La somministrazione combinata del SAHA con un inibitore di PARP (*poly(ADP-ribose) polymerases*), una proteina coinvolta in molteplici processi cellulari, quali in riparo del DNA, l'integrità genomica, la proliferazione, il controllo della trascrizione e l'apoptosi, ha dimostrato avere forti effetti sinergici *in vitro* sulla vitalità cellulare e sull'apoptosi di cellule di carcinoma tiroideo anaplastico (Baldan et al., 2015).

I costi associati alla gestione del carcinoma tiroideo sono destinati a salire negli anni a venire (Brown *et al.*, 2011). Parte di questo aumento deriva dai costi del trattamento standard del PTC, istotipo che ha visto un grande aumento per quanto riguarda il numero di diagnosi. Per quanto fattori quali l'età o il sesso maschile aumentino la possibilità di avere una patologia progressiva, gli strumenti diagnostici attuali non sono in grado di predire quali pazienti siano in grado di rispondere alla terapia minima. Per quanto la chirurgia rimanga necessaria per una stadiazione adeguata, un utilizzo più giudizioso della RAI consentirebbe un contenimento dei costi.

In futuro nuovi strumenti, quali la genetica molecolare per discriminare tra tumori più o meno aggressivi, consentiranno ai clinici di individuare per ciascun paziente la terapia più appropriata.

Per quanto i pazienti con cancro tiroideo avanzato rappresentino una minoranza, richiederanno valutazione e terapia continuativa determinando quindi un aumento dei costi sanitari. La terapia "targettata" rappresenta un'opportunità terapeutica nuova per questi pazienti anche se i criteri di selezione dei candidati ideali dovranno essere rifiniti e migliorati (Brown *et al.*, 2011).

## SCOPO DELLA TESI

Le RNA binding proteins sono elementi chiave nella regolazione dell'espressione genica a livello post-trascrizionale e pertanto ricoprono un ruolo fondamentale nello sviluppo e nella fisiologia della cellula.

Diversi studi hanno evidenziato come l'espressione aberrante delle RNA binding proteins sia direttamente coinvolta nello sviluppo di numerose patologie, tra le quali il cancro. Tra le RNA binding proteins che risultano essere maggiormente correlate allo sviluppo tumorale troviamo HuR, over-espressa in numerosi tipi di neoplasia e direttamente implicate nel *processing* di diversi oncogeni.

In questo progetto di dottorato abbiamo voluto esplorare i livelli di espressione e il coinvolgimento di HuR nella tumorigenesi tiroidea, per il quale non sono presenti dati in letteratura. Per questo scopo abbiamo verificato l'espressione di HuR in tiroide sia *in vivo*, attraverso un array tissutale, sia *in vitro*, utilizzando diverse linee cellulari tumorali e non. Inoltre abbiamo valutato gli effetti biologici del silenziamento di HuR, sia in termini di vitalità cellulare, sia come alterazione dell'espressione genica, valutata mediante RNA-seq, nelle Nthy-ori-3.1, una linea normale di tiroide, e nelle BCPAP, linea cellulare derivata da carcinoma tiroideo papillifero.

Dato che gli effetti del silenziamento di HuR sul trascrittoma delle due linee risultavano essere diversi, un ulteriore obiettivo di questo lavoro è stata la valutazione dei profili di legame di HuR ai suoi target nelle due linee, al fine di verificare la possibile cellulo-specificità di HuR.

## MATERIALI E METODI

### Tessuti umani e colture cellulari

Dall'archivio dell'Istituto di Anatomia Patologica dell'Università di Udine è stata selezionata una serie di 12 campioni derivanti da ghiandole tiroidee normali, 25 FAs, 23 FTCs, 36 PTCs e 8 ATCs. Tutti i tessuti presi in analisi derivano da pazienti con confermata diagnosi.

In questo studio sono state inoltre utilizzate le linee cellulari BCPAP e TPC1, derivanti da carcinoma tiroideo papillifero; FTC133 e WRO, derivanti da carcinoma tiroideo follicolare; SW1736 e FRO, derivanti da carcinoma anaplastico, e le Nthy-ori-3.1, una linea immortalizzata di epitelio follicolare tiroideo. Le linee cellulari sono state cresciute in RPMI-1640 o DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) addizionati con 10% di siero bovino fetale (FBS), glucosio 4.5 g/L, L-glutammina 4 mM e gentamicina (50 mgr/ml). Le cellule sono state cresciute a 37°C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub>.

### Immunoistochimica

Sezioni di tessuto paraffinato di 5 µm sono state montate su un vetrino SuperFrost Plus (Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany) e posti nel modulo di pretrattamento PT Link (DAKO A/S, Glostrup, Denmark), il quale effettua automaticamente i processi di deparaffinizzazione, reidratazione e smascheramento degli epitopi utilizzando la soluzione a basso pH Target Retrieval Solution a 98°C per 40 minuti.

L'attività perossidasi endogena è stata bloccata incubando per 5 minuti in Peroxidase Block solution (DAKO).

Nel caso delle colture cellulari, le linee Nthy-ori-3.1 e BCPAP sono state fissate con una soluzione di acido acetico 5% in etanolo per 10 minuti a temperatura ambiente. Successivamente sono state lavate con una soluzione di PBS e saponina 0.1% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

L'array tissutale e le colture cellulari sono stati quindi incubati, a temperatura ambiente, per circa 60 minuti con l'anticorpo primario policlonale di coniglio anti-HuR (Millipore) diluito 1:50. Dopo i lavaggi i vetrini sono stati incubati con il sistema DAKO EnVision FLEX (DAKO), secondo le istruzioni della ditta. Per la visualizzazione è stato usato come cromogeni il 3-3-diaminobenzidine tetrahydrochloride e l'ematossilina di Mayer.

Le sezioni sono state acquisite al microscopio ottico ad alto ingrandimento (400x, 40x e 10x) e la colorazione è stata valutata in maniera semi-quantitativa come percentuale di cellule positive. L'intensità della colorazione è stata classificata in debole, moderata e forte. Il punteggio finale è stato calcolato moltiplicando la percentuale di colorazione per l'intensità (histoscore).

## Preparazione di estratti proteici

L'estrazione delle proteine totali delle cellule Nthy-ori-3.1, BCPAP, TPC1, FRO, SW1736, 8505C e WRO è stata effettuata lisando il pellet cellulare con *Total lysis buffer* (Tris-HCl pH 7.6 50 mM, NaCl 150 mM, NP-40 1%, Sodio Deossicolico 0.5%, SDS 0.1%) addizionato con PMSF (Sigma) e un cocktail di inibitori delle proteasi. Il lisato è stato centrifugato a 14000g per 10 minuti. Il surnatante è stato raccolto e quantizzato mediante saggio di Bradford (Bio-Rad).

L'estrazione delle proteine citosoliche e nucleari delle linee cellulari Nthy-ori-3.1 e BCPAP è stata effettuata utilizzando due tamponi a diversa forza ionica. Il tampone T1 (HEPES pH 7.9 10 mM, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.1 mM, EDTA pH 8 0.1 mM) è un buffer ipo-osmotico che induce il rigonfiamento delle cellule fino alla rottura della membrana plasmatica, con conseguente rilascio in soluzione delle proteine citoplasmatiche. La membrana plasmatica e i nuclei sono stati fatti sedimentare sottoponendo il lisato cellulare a centrifugazione a 800g per 10 minuti. Il surnatante contenete le proteine citoplasmatiche è stato raccolto, mentre il pellet è stato risospeso, incubato per 30 minuti con il tampone iper-tonico T2 (HEPES pH 7.9 20 mM, NaCl 420 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, EDTA pH 8 0.1 mM, glicerolo 5%) e

sottoposto a centrifugazione a 15000g per 20 minuti. Il surnatante contenete le proteine nucleari è stato raccolto e quantizzato mediante saggio di Bradford (Bio-Rad).

## Western Blot

Gli estratti proteici sono stati separati mediante elettroforesi su gel discontinuo di acrilammide con sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE).

Il “gel di compattazione” (stacking gel) è un gel di poliacrilammide al 4% p/v in acrilammide, Tris-HCl 125 mM, pH 6.8, SDS 0.1% p/v. Il “gel di separazione” (running gel) è costituito da poliacrilammide al 12%, in Tris-HCl 375 mM, pH 8.8, SDS 0.1% p/v.

Gli estratti proteici sono stati incubati a 95°C per 10 minuti dopo aver aggiunto il buffer di caricamento (Tris-HCl pH 6.8 1 M, Glicerolo 10%, SDS 2%, blu di Bromofenolo 0.001%,  $\beta$ mercaptoetanololo 2%). La corsa è stata condotta nel tampone di corsa (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1% p/v) inizialmente ad un amperaggio di circa 0,5 mA per cm di gel, in seguito, durante la fase di separazione, ad un amperaggio di circa 1 cm per gel.

Successivamente è stato utilizzato il metodo dell'elettrotrasferimento ad umido mediante tank transfer unit (Amersham). Sono stati disposti nell'ordine, dal catodo all'anodo: due fogli di carta 3MM (Whatman), il gel di poliacrilammide, una membrana di nitrocellulosa (Schleicher & Schuell, Keene, NH) e altri due fogli di carta 3 MM. Il trasferimento è stato effettuato in 2 ore a 200mA e 70 V nella soluzione di trasferimento (Tris 50mM, glicina 40mM, Metanolo 20% v/v).

La membrana di nitrocellulosa è stata incubata con la soluzione di saturazione (latte scremato in polvere 5% p/v, tween-20 0,1% v/v in PBS) per 1 ora in lenta agitazione.

Il foglio di nitrocellulosa è stato incubato con gli anticorpi primari e secondari secondo i tempi e le diluizioni indicate in Tabella 1.

Tabella 1: Diluizioni e tempi di incubazione con gli anticorpi

PROTEINA	ANTICORPO PRIMARIO	DILUIZIONE E TEMPO DI INCUBAZIONE	ANTICORPO SECONDARIO	DILUIZIONE TEMPO DI INCUBAZIONE
<b>HuR</b>	RIPAb+ HuR – RIP Antibody (Millipore)	1:500 O.N. a 4°C	Anti-rabbit	1:4000 1h 30' RT
<b>B-actina</b>	Anti-β-actina (Abcam)	1:1000 O.N. a 4°C	Anti-rabbit	1:4000 1h 30' RT

Dopo l'incubazione con l'anticorpo secondario, le membrane sono state lavate per 3 volte per 5 minuti in PBS Tween 0,1% e poi i blot sono stati sviluppati utilizzando la procedura di chemiluminescenza ECL Super Signal (Pierce). La quantizzazione della proteina di interesse è stata normalizzata rispetto alla quantità di proteina β-actina totale dopo rilevamento dell'intensità delle bande mediante videodensitometro Uvitec Alliance con il programma UVIband software (Uvitec, Cambridge, UK).

## Trasfezione cellulare e silenziamento di HuR

Il fenomeno dell'*RNA interference* o RNAi è un processo biologico tramite il quale piccole molecole di RNA inibiscono l'espressione genica attraverso la degradazione di specifici mRNA. Le molecole *small interfering RNA* (siRNA) sono composte da circa 20-25 basi e vengono prodotte attraverso clivaggio enzimatico di lunghe molecole di RNA a doppio filamento (dsRNAs) ad opera dell'endoribonucleasi Dicer. I siRNA prodotti da Dicer vengono legati dal complesso *RNA-induced silencing complex* (RISC). La molecola di RNA a singolo filamento del siRNA funge da template a RISC che è così in grado di individuare la molecola mRNA complementare. Una volta trovata, Argonata, una proteina facente parte del complesso RISC, viene attivata e va a clivare l'mRNA.

Tipicamente i siRNA sintetizzati per il silenziamento genico sono molecole di RNA a doppio filamento di 21 nucleotidi, che mimano il prodotto di Dicer e quindi non necessitano di essere processati dall'enzima. Nel nostro laboratorio abbiamo invece deciso di utilizzare

molecole di RNA a doppio filamento lunghe 27 nucleotidi, che necessitano quindi del processamento ad opera di Dicer. È ormai noto che questa metodica risulta essere notevolmente più efficiente rispetto all'utilizzo di siRNA "tradizionali".

Il silenziamento transiente di HuR è stato condotto sulle linee cellulari Nthy-ori-3.1 e BCPAP utilizzando il kit TriFECTa RNAi (Integrated DNA Technologies Inc, Coralville, IA, USA). Gli oligonucleotidi (siRNA) sono stati trasfettati alla concentrazione di 5 nM utilizzando il reagente di trasfezione DharmaFECT 1 (GE Healthcare Dharmacon Inc.) secondo le istruzioni del produttore. Come controllo è stato utilizzato un oligonucleotide che ha come target una sequenza non presente nel trascrittoma umano. Il giorno prima della trasfezione, le cellule sono state piastrate in mezzo di coltura privo di antibiotico. Il giorno della trasfezione i siRNA e la DharmaFECT sono stati diluiti separatamente in terreno privo di siero ed antibiotici ed incubati per 5 minuti a temperatura ambiente. Successivamente le soluzioni contenenti i siRNA e la DharmaFECT sono state unite ed incubate a temperatura ambiente per 20 minuti, in modo da permettere la formazione dei complessi reagente-siRNA. La soluzione così ottenuta è stata addizionata a terreno fresco e somministrata alle cellule da trasfettare. Dopo 72 ore di trasfezione, le cellule sono state raccolte e l'efficienza del silenziamento genico è stata valutata mediante l'analisi dei livelli di proteina HuR in Western Blot.

### Annessina V assay

Durante i fenomeni apoptotici le cellule subiscono diverse modificazioni morfologiche che portano alla perdita dell'integrità di membrana, alla formazione dei corpi apoptotici ed infine alla morte della cellula. Uno dei cambiamenti che caratterizzano il processo apoptotico è la traslocazione della fosfatidilserina (PS) dal lato interno a quello esterno della membrana plasmatica.

Per valutare l'esposizione della PS sullo strato esterno della membrana si utilizza l'Annessina V, una proteina che in presenza di calcio è in grado di legarsi alla PS con elevata

affinità, marcata ad un fluoroforo. Inoltre, utilizzando oltre all'Annexina V un colorante intercalante la doppia elica del DNA, come lo Ioduro di Propidio (PI), si può discriminare tra le cellule morte per apoptosi e per necrosi, poiché il PI non è in grado di entrare nelle cellule con la membrana plasmatica integra, ovvero quelle vive e quelle nella prima fase dell'apoptosi. L'Annexina V, invece, si lega sia alle cellule in apoptosi che a quelle morenti che hanno perso l'integrità di membrana. Pertanto le cellule apoptotiche saranno quelle cellule che risulteranno essere positive all'Annexina V, ma negative al PI.

Dopo la trasfezione con i siRNA di HuR, le cellule Nthy-ori-3.1 e BCPAP sono state staccate dalla piastra con Trispsina-EDTA, lavate con PBS e risospese in 195  $\mu$ l di buffer di legame (BB 10 mM; HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, and 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>). Ai campioni sono stati quindi aggiunti 5  $\mu$ l di Annexina V coniugata con fluoresceina (Annexin V-FITC; Bender Med Systems, Vienna, Austria) e tenuti in incubazione per 10 minuti a temperatura ambiente. Dopo lavaggio, le cellule sono state risospese in 190  $\mu$ l di BB addizionato con 10  $\mu$ l di soluzione di PI (concentrazione finale 1  $\mu$ g/ml). L'analisi citofluorimetrica è stata effettuata con CyAN, Dako Cytomation, utilizzando il software Summit (Flow cytometer, Beckman Coulter). I segnali *Forward scatter* (FSC) e *side scatter* (SSC) sono stati acquisiti in scala lineare. I segnale fluorescenti di FITC e PI generati dall'eccitazione a 488 nm sono stati rilevati in scala logaritmica. I segnali di FSC e SSC e la fluorescenza sono stati acquisiti per 10<sup>4</sup> cellule utilizzando l'intensità del FSC come parametro principale. I dati sono espressi come intensità di fluorescenza media (FI).

## Sequenziamento

L'RNA totale delle linee cellulari Nthy-ori-3.1 e BCPAP è stato estratto con il kit RNeasy minikit (QIAGEN, Milano, Italia), secondo le modalità descritte dalla ditta fornitrice.

Il sequenziamento dell'RNA è stato effettuato presso l'Istituto di Genomica Applicata (IGA) di Udine, in collaborazione con la dr.ssa Radovic.

Per la preparazione della libreria è stato utilizzato il kit TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Human/Mouse/Rat (Illumina, San Diego, CA), secondo le istruzioni della ditta produttrice, utilizzando come input iniziale 200 ng di RNA (R.I.N. >7). Sia l'RNA dei campioni che le librerie prodotte sono state quantizzate mediante il Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA) e la qualità è stata testata con il Bioanalyzer Agilent 2100 RNA Nano assay (Agilent technologies, Santa Clara, CA). Le librerie ottenute sono state quindi processate con l'Illumina cBot per la generazione di cluster, secondo le modalità descritte dal produttore e sequenziate in modalità *single-ed* con HiSeq2500 (Illumina). I dati grezzi ottenuti dal sequenziamento sono stati processati utilizzando la versione 1.8.2 del software CASAVA della *pipeline* Illumina.

I file delle sequenze grezze sono stati validati in termini di qualità utilizzando FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Al fine di evitare dati di bassa qualità, gli adattatori sono stati rimossi con Cutadapt (Vezi et al., 2012) e le basi di bassa qualità sono state eliminate con ERNE (Martin, 2011). Per l'analisi dei geni differenzialmente espressi, le conte di qualità sono state processate come file FASTQ utilizzando TopHat (Bowtie 2 version 2.2.0) (Trapnell, et al., 2009; Trapnell, et al., 2012; Trapnell, et al., 2013). Le conte sono state mappate sul genoma umano di riferimento GRCh37/hg19 e la loro abbondanza è stata valutata e normalizzata utilizzando Cufflinks (Trapnell et al., 2012); in questo modo abbiamo ottenuto per ogni singolo gene i valori di FPKM (Fragments Per Kilobase Of Exon Per Million Fragments Mapped). Successivamente il pacchetto Cuffdiff del software Cufflinks 2.2.0 è stato utilizzato per calcolare i livelli di espressione differenziale tra il campione silenziato e quello di controllo per tutti i singoli geni delle due linee cellulari e per calcolare la significatività statistica delle alterazioni identificate. In un'analisi successiva abbiamo deciso di considerare come validi solo i geni che avessero un valore di FPKM maggiore di 0.5 e la cui espressione differenziale (Fold Change - FC), espressa come logaritmo in base 2, fosse superiore a 2 e risultasse essere significativa (*False discovery rate* < 0.005).

## Retrotrascrizione

L'RNA totale è stato retrotrascritto nel DNA complementare (cDNA) usando random primers e 200 unità di SuperScript III Reverse Transcriptase in presenza di inibitori delle RNAsi.

La SuperScript III RT utilizza l'RNA a singolo filamento, in presenza di un primer, per sintetizzare un DNA a singolo filamento complementare. 150 ng di RNA, portati al volume finale di 10.6 µl mediante aggiunta di H<sub>2</sub>O sterile, sono stati addizionati con 0.4 µl di Random Hexaprimers (500 ng/µl) (Invitrogen) e 2 µl di mix di dNTPs 10 mM (Invitrogen). I campioni sono stati quindi denaturati a 70°C per 10 minuti e successivamente posti in ghiaccio.

Per ogni campione è stata allestita la seguente miscela di reazione:

- 4 µl di Buffer 5X (Tris 250 mM a pH 8,3; KCl 375 mM; MgCl<sub>2</sub> 15 mM)
- 1 µl di DTT 0,1M
- 4 µl di dNTPs 200mM
- 1 µl di RNasi OUT 40U/µl
- 1 µl di SuperScript III RT 200U/µl

Dopo aver aggiunto ai campioni denaturati 7 µl della miscela di reazione sopra indicata essi sono stati mantenuti a temperatura ambiente per 5 minuti.

La retrotrascrizione è stata eseguita alla temperatura di 55°C per 60 minuti, 70°C per 15 minuti e 45°C per 5 minuti al termine dei quali i campioni sono stati portati al volume di 100 µl mediante aggiunta di 80 µl di H<sub>2</sub>O sterile e posti in ghiaccio.

## Real Time PCR

Il principio della Real-Time PCR si basa sulla rilevazione e quantificazione di un segnale fluorescente durante l'amplificazione PCR, in quanto la quantità di fluorescenza emessa è direttamente proporzionale alla quantità di prodotto di PCR.

In questo studio la metodica di Real Time PCR utilizzata è quella che prevede l'uso del Sybr Green, un colorante in grado di aumentare i livelli di emissione di fluorescenza quando si lega al solco minore del dsDNA (fluorescenza letta a 530 nm), utilizzando la *supermix* Platinum Sybr Green QPCR (Life Technologies) e il sistema ABI Prism 7300 Sequence Detection (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

L'analisi dell'espressione genica è stata eseguita con il metodo del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , il quale assume che sia il gene target che il gene endogeno siano amplificati con la stessa efficienza, utilizzando l' SDS software (Applied Biosystems). Secondo il metodo del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  per ciascun campione i cicli (CT) del gene target vengono normalizzati con quelli del gene endogeno mediante la formula:  $\Delta Ct_{(test)} = Ct_{(gene\ target,\ test)} - Ct_{(gene\ endogeno,\ test)}$ . I  $\Delta Ct$  dei campioni vengono quindi a loro volta normalizzati con il  $\Delta Ct$  del campione calibratore, un campione usato come riferimento per il confronto relativo dei risultati, mediante la formula:  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(test)} - \Delta Ct_{(calibratore)}$ . Infine il rapporto dell'espressione viene calcolato come  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Il risultato ottenuto è la variazione dell'espressione del gene target nel campione test rispetto al calibratore, normalizzati sull'espressione del gene endogeno. Normalizzando l'espressione del gene target a quello del gene endogeno si compensano le differenze nelle eventuali quantità dei campioni.

La reazione di PCR è stata effettuata in un volume finale di 12  $\mu$ l, utilizzando 2  $\mu$ l di cDNA come template. Le condizioni di PCR utilizzate sono le seguenti: incubazione a 50°C per 2 minuti, denaturazione a 95°C per 10 minuti e successivi 40 cicli di amplificazione composti da 15 secondi di denaturazione a 95°C, seguiti 1 minuto a 60°C per l'ibridazione/estensione. Ciascun campione è stato corso in triplicato e come normalizzatore dei livelli di RNA è stato usato il gene endogeno GAPDH.

Le sonde oligonucleotidiche utilizzate in Real Time PCR sono state progettate utilizzando il software PrimerExpress (Applied Biosystems) ed acquistate da Sigma-Aldrich (Tab. 2).

Tabella 2: Sequenze oligonucleotidiche dei primers usati in qPCR

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
<b>GAPDH</b>	5'-CACCAGGTGGTCTCCTCTGACT-3'	5'-GTGGTCGTTGAGGGCAATG-3'
<b>IFIT3</b>	5'-GCAGCCAAATGTTATGAGAAGGA-3'	5'-GATGCTGACAGGAAAATACTGCCTAT-3'
<b>ADIRF</b>	5'-AGCGGCAGCTCAGCAAGT-3'	5'-TAGCAGTCTTGTCGATGGTTTCC-3'
<b>ANGPTL4</b>	5'-AACAGCAGGATCCAGCAACTC-3'	5'-GCTTTGCAGATGCTGAATTCG-3'
<b>ARRB2</b>	5'-CTGTGAGACAGTACGCCGACAT-3'	5'-CGAGTTGAGCCACAGGACACT-3'
<b>FGFBP1</b>	5'-AGCCTGGCTCCTGTTGAATAGT-3'	5'-GCAGTGCGAGTGAATTGCA-3'
<b>ITGB4</b>	5'-GAGGCCTGAGAAGCTGAAGGA-3'	5'-TCAGGCTGATGACGTTCTTGAA-3'
<b>KISS1</b>	5'-GCAAGCCTCAAGGCACTTCT-3'	5'-GGAAAAGCAGTAGCTGCCAAGA-3'
<b>LMOD1</b>	5'-CCAACCACATCACAGGCAAAG-3'	5'-TCGGTCAGCGTGTGTTCTG-3'
<b>PLAU</b>	5'-GGCCCCGCTTTAAGATTATTG-3'	5'-TCCTGTAGATGGCCGCAA-3'
<b>PPL</b>	5'-CAGCAGCCGGAAGTAGAAGTG-3'	5'-CCAGTTCCTTCTGATCTTCCA-3'
<b>ROBO4</b>	5'-CTCAAATGAGCTGGTTACTCGTCAT-3'	5'-GCTGGGTCTGTTGACTCTGAGTT-3'
<b>SERPINB2</b>	5'-GGCCAAGGTGCTTCAGTTTAAT-3'	5'-CATGAACCCACAGCTGGTAAAG-3'

## RBP Immunoprecipitation (RIP)

L'immunoprecipitazione delle RNA binding protein (RIP) è un metodo utilizzato per identificare molecole di RNA associate a specifiche proteine. Nel nostro caso la RIP è stata utilizzata per valutare il profilo di legame dell'RBP HuR.

La metodica RIP prevede l'immunoprecipitazione di complessi endogeni formati da RBP e il co-isolamento di qualsiasi specie di RNA ad essi associata. La seguente purificazione di questi RNA consente di identificare gli mRNA, così come anche i non-coding RNA, ad essi associati, attraverso metodiche di analisi dell'RNA quali RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*), array (RIP-chip) o sequenziamento (RIP-seq)(Fig.1).

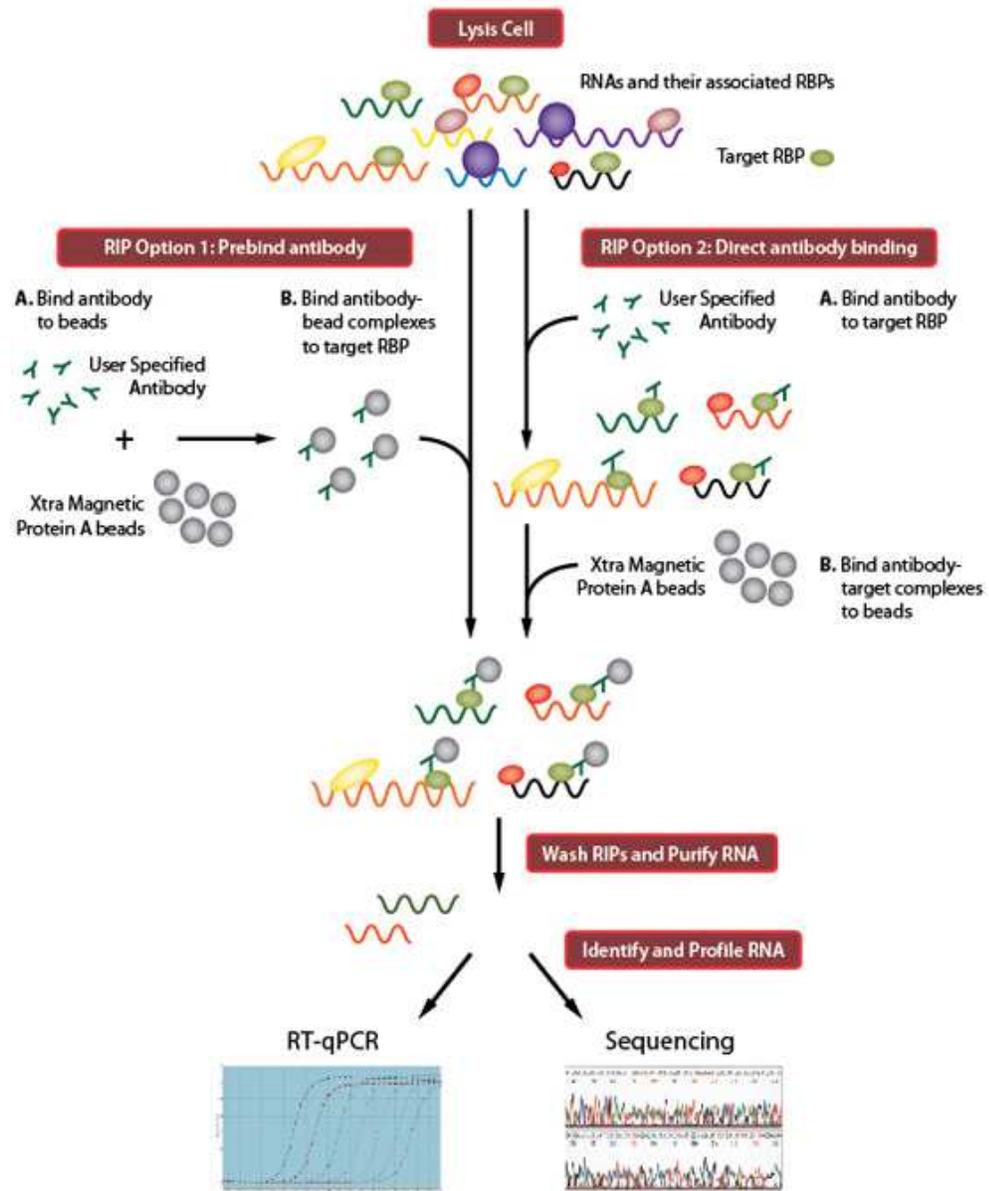


Figura 1. Schema della metodica RIP.

Per studiare il profilo di legame della proteina HuR nelle linee cellulari Nthy-ori-3.1 e BCPAP abbiamo utilizzato il kit EZ-Magna RIP™ RNA-Binding Protein Immunoprecipitation (Millipore), seguendo le indicazioni del produttore.

Il protocollo di RIP utilizzato prevede:

**I. Preparazione del lisato cellulare**

Le cellule ( $2 \times 10^7$  per condizione) vengono staccate dalla piastra con Trispsina-EDTA, lavate con PBS e lisate con 100  $\mu$ l di RIP lysis Buffer completato con un cocktail di inibitori delle proteasi e con inibitori delle RNasi.

**II. Preparazione delle biglie magnetiche per l'immunoprecipitazione**

50  $\mu$ l di biglie magnetiche per ciascuna condizione vengono incubati overnight a 4°C in rotazione con 5  $\mu$ g di anticorpo (RIPAb+ anti-HuR Millipore; o RIPAb+ anti-IgG Millipore come controllo negativo). Dopo l'incubazione le biglie sono state sottoposte a diversi lavaggi con RIP Wash Buffer, per rimuovere l'anticorpo non legato, e risospese in 900  $\mu$ l di RIP Immunoprecipitation Buffer completato con EDTA 0.5M ed inibitori delle RNasi.

**III. Immunoprecipitazione dei complessi RBP-RNA (RIP)**

Il lisato cellulare viene centrifugato a 14000 rpm per 10 minuti a 4°C. Al termine della centrifugazione, 10  $\mu$ l di surnatante, che costituiranno l'input, vengono prelevati e conservati a -80°C; mentre altri 100  $\mu$ l vengono aggiunti alle biglie magnetiche coniugate con l'anticorpo per poi essere sottoposti ad incubazione overnight a 4°C in rotazione.

**IV. Purificazione dell'RNA**

Dopo numerosi lavaggi con RIP Wash Buffer ciascun immunoprecipitato viene incubato con 150  $\mu$ l di RIP proteinase K Buffer a 55°C per 30 minuti in shaking per permettere la digestione delle proteine. Allo stesso procedimento viene sottoposto anche l'input. A questo punto le biglie magnetiche vengono eliminate e i surnatanti risospesi in 250  $\mu$ l di RIP Wash Buffer per poi essere sottoposti a purificazione con aggiunta di fenolo e una soluzione di cloroformio:alcol isoamilico in proporzione 24:1. Dopo centrifugazione per 10 minuti a 14000 rpm, vengono prelevati 350  $\mu$ l di fase acquosa a cui viene aggiunto un pari volume di

cloroformio e centrifugati per 10 minuti a 14000 rpm. A 270 µl di fase acquosa vengono aggiunti 50 µl di Salt solution I, 15 µl di Salt Solution II, 5 µl di Precipitate enhancer e 850 µl di etanolo 100%. Il tutto viene vortexato e congelato a -80°C overnight per far precipitare l'RNA. Dopo centrifugazione a 14000 rpm per 30 minuti a 4°C il pellet viene lavato con etanolo 80% e dopo una seconda centrifugazione per 15 minuti a 14000 r.p.m a 4 °C il pellet viene risospeso in 20 µl di acqua sterile RNase-free.

L'RNA isolato mediante il kit EZ-Magna RIP è stato poi analizzato mediante sequenziamento presso l'IGA con lo stesso protocollo utilizzato per l'RNA-seq e precedentemente descritto.

In questo studio, per ciascuna linea, abbiamo effettuato due diverse RIP-seq ciascuna delle quali era costituita a sua volta da un pool di due reazioni di immunoprecipitazione. Le due RIP-seq sono state quindi analizzate mediante Cufflinks come replicati biologici. Il pacchetto Cuffdiff è stato utilizzato per calcolare i livelli di espressione differenziale dei singoli geni del campione immunoprecipitato con HuR rispetto al controllo negativo (IgG). Sono stati quindi considerati per le successive analisi sono i geni significativamente arricchiti da HuR rispetto al controllo con un Fold Change (calcolate come logaritmo in base 2) maggiore di 2 e con valori di FPKM maggiori di 0.5.

Successivamente, sempre attraverso l'utilizzo di Cuffdiff, è stato calcolato l'arricchimento dei geni co-immunoprecipitati con HuR rispetto all'input. Per le analisi successive sono stati considerati solamente i geni risultati arricchiti significativamente sia rispetto all'input, sia rispetto al controllo negativo.

## Elettroforesi bidimensionale

L'analisi elettroforetica bidimensionale (2-DE) permette di separare le proteine sia in base al loro punto isoelettrico (prima dimensione in gradiente di pH), sia in base al loro peso molecolare (seconda dimensione mediante SDS-PAGE).

La 2-DE della proteina HuR è stata effettuata in collaborazione con il dottor Vascotto, dell'Università di Udine.

Per l'analisi 2-DE sono stati utilizzati estratti nucleari delle linee Nthy-ori-3.1 e BCPAP. Campioni proteici, contenenti rispettivamente 70 µg e 35 µg per Nthy-ori-3.1 e BCPAP, sono stati diluiti in Rehydration Buffer (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 2%) completato con ditiotreitolo (DTT) e anfoline. La prima dimensione o isoelettrofocalizzazione (IEF) è stata eseguita caricando i campioni su strisce IPG, gel preformati di acrilamide/bisacrilamide copolimerizzati su un supporto di plastica con miscela di immobiline, di 7 cm e con un intervallo di pH di 3-10. L'IEF è stata eseguita con l'apparecchio IPGphor II system (GE Healthcare) con il protocollo descritto in tabella 3:

*Tabella 3. Protocollo di isoelettrofocalizzazione*

<b>Step</b>	<b>Voltaggio (V)</b>	<b>Tempo</b>
<b>I step</b>	50	12 h
<b>II step</b>	100	2h
<b>III step</b>	50	1 h
<b>IV step</b>	1000	1 h
<b>V step</b>	8000	6 h
<b>VI step</b>	50	2 h

Una volta completato il protocollo di IEF le strisce IPG sono state equilibrate mediante due incubazioni di 15 minuti con Equilibration buffer (Tris HCl 50 mM pH 8.8, Urea 6 M, Glicerolo 30%, SDS 2%) addizionato con DTT 1% e poi con Iodoacetammide 2.5% per favorirne il trasferimento in seconda dimensione.

La seconda dimensione è stata eseguita caricando le strisce IPG equilibrate su gel di separazione di poliacrilammide al 12%. Il protocollo utilizzato per la seconda dimensione è lo stesso utilizzato per il western blot e già descritto nella sezione precedente.

## Analisi Statistiche

Tutti i dati ottenuti in questo lavoro sono stati espressi come media  $\pm$  SD, e la significatività dei risultati è stata analizzata mediante test *t* di Student o one-way ANOVA eseguiti utilizzando il software GraphPAD (San Diego, CA, USA).

## RISULTATI

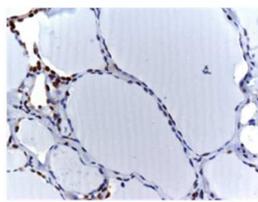
### Espressione di HuR in tiroide

Dal momento che l'RNA binding protein HuR, come precedentemente descritto nell'introduzione, sembra essere coinvolta nello sviluppo di diversi tumori e che la sua espressione risulta essere alterata in numerose neoplasie, si è voluto valutare l'espressione di HuR nel tumore tiroideo, per il quale non sono presenti dati in letteratura.

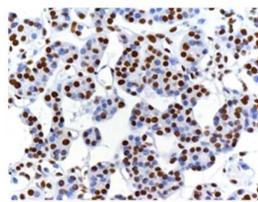
### Espressione tiroide di HuR *in vivo*

Al fine di caratterizzare l'espressione di HuR e la sua localizzazione subcellulare nei tumori tiroidei, è stata condotta un'analisi immunohistochimica, in collaborazione con l'Istituto di Anatomia Patologica dell'Università degli Studi di Udine. A questo scopo è stato realizzato un pannello costituito da 12 campioni tissutali di ghiandola tiroidea sana (NTs), 25 FAs, 23 FTCs, 36 PTCs e 8 ATCs.

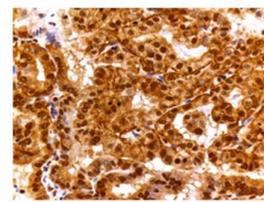
A



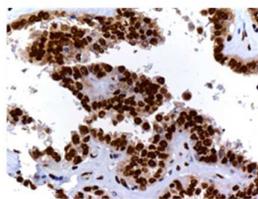
**Normal Thyroid**



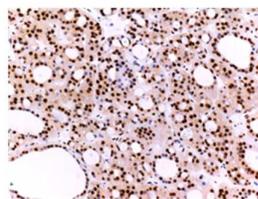
**Follicular Adenoma**



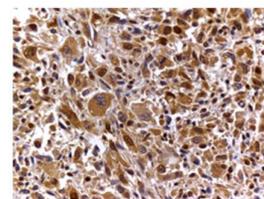
**Papillary Carcinoma**



**Papillary carcinoma**



**Follicular Carcinoma**



**Anaplastic Carcinoma**

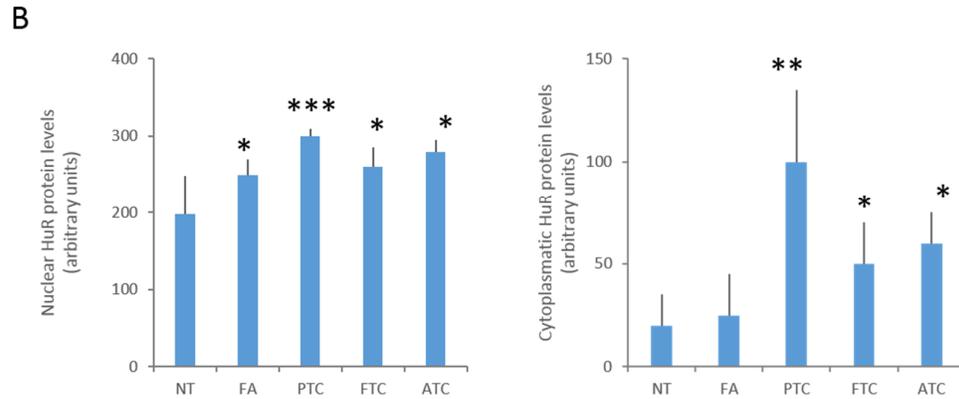


Figura 1. Espressione di HuR nei tumori tiroidei. Pannello A: immagini rappresentative dell'espressione di HuR in tessuto tiroideo normale, FAs, PTCs, FTCs e ATCs. Pannello B: quantizzazione dell'espressione di HuR nei tessuti normali e tumorali di tiroide ottenuta mediante IHC score. I risultati vengono rappresentati come media  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.0001$  calcolato mediante one-way ANOVA.

Come si può vedere nella Figura 1, la proteina HuR è localizzata prevalentemente a livello nucleare, sia nei tessuti normali che in quelli tumorali. Inoltre, come descritto per altre neoplasie, vi è un aumento dei livelli di questa RBP nei tessuti tumorali rispetto a quelli normali. In particolare, a livello nucleare, vi è una significativa over-espressione di HuR in tutti i tessuti tumorali, compresi gli FAs, ed in particolare nei PTCs.

In letteratura viene descritto come, nei tessuti tumorali, oltre all'over-espressione dell'RBP, vi sia soprattutto un aumento della sua frazione citoplasmatica. I nostri dati confermano come questo avvenga anche in tiroide, con un incremento significativo della frazione citoplasmatica di HuR in tutti i tumori tiroidei maligni ed in particolare nei PTC, dove, nonostante la forte eterogeneità caratteristica di questo tipo di tumore, HuR risulta essere mediamente 5 volte maggiore rispetto al tessuto normale.

### Espressione di HuR *in vitro*

Poiché i dati presenti in letteratura sulla deregolazione dell'espressione di HuR nei tumori vengono confermati anche in tiroide, siamo andati a valutare in maniera quantitativa, mediante Western Blot, i livelli di proteina HuR in una linea cellulare di tiroide non tumorigenica e in sei diverse linee di tumore tiroideo (Fig. 2).

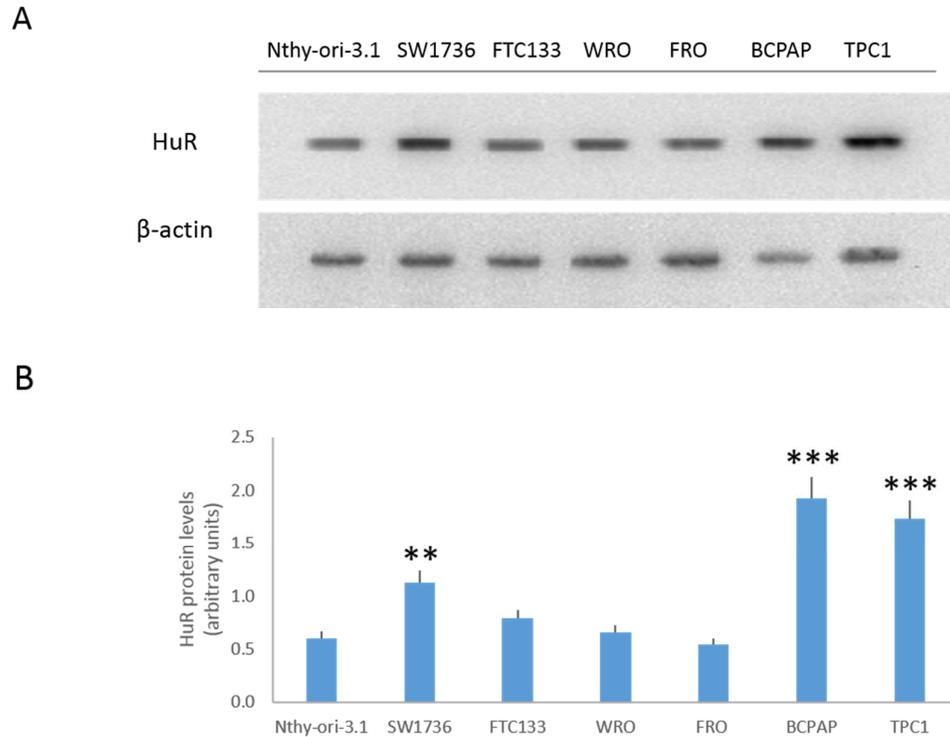


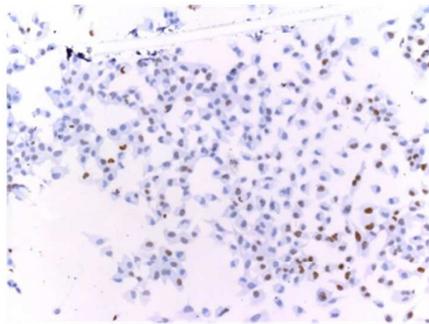
Figura 2. Espressione di HuR in linee cellulari di tiroide. Pannello A: Western blot relativo all'espressione di HuR in linee cellulari di tiroide tumorali e non. Pannello B: quantizzazione della proteina HuR dopo normalizzazione rispetto ai livelli di proteina  $\beta$ -actina. I risultati vengono rappresentati come media  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.0001$  calcolato mediante one-way ANOVA.

L'analisi di Western Blot ha dimostrato che in tre delle linee cellulari analizzate, le SW1736 (ATC), BCPAP e TPC1 (PTC), vi è un'over-espressione di HuR rispetto alla linea normale, le Nthy-ori-3.1. In particolare si osserva che nelle SW1736 HuR è 1.9 volte più espresso rispetto alla linea tiroidea normale, mentre in BCPAP e TPC1 l'espressione della proteina è superiore di 3.2 e 2.9 volte, rispettivamente. Nelle altre linee cellulari analizzate, invece, non vi è una significativa differenza nei livelli di proteina, se comparate alle Nthy-ori-3.1.

### Localizzazione di HuR *in vitro*

Al fine di determinare se, come già visto nei tessuti, anche nelle linee cellulari tiroidee vi fosse una diversa localizzazione di HuR tra linee tumorali e non, è stata condotta un'analisi di immunocistochemica. Per quest'analisi e per tutti i successivi esperimenti sono state

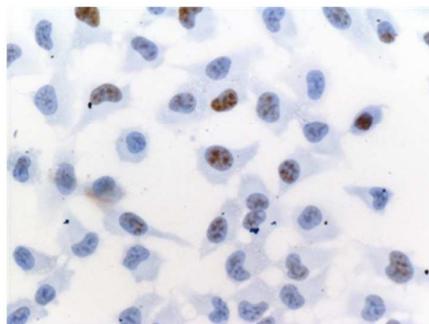
utilizzate la linea normale Nthy-ori-3.1 e le BCPAP, ovvero la linea tumorale che over-esprimeva maggiormente HuR.



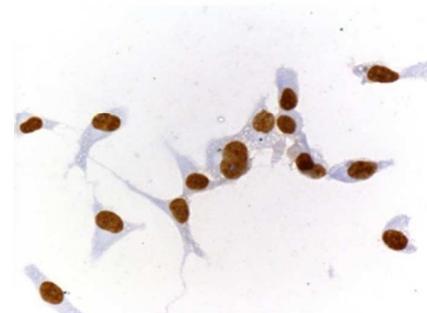
Nthy-ori-3.1 10X



BCPAP 10X



Nthy-ori-3.1 40X



BCPAP 40X

Figura 3. Analisi immunocitochimica dell'espressione e della localizzazione di HuR nelle linee cellulari di tiroide Nthy-ori-3.1 e BCPAP.

Come si può vedere nella Figura 3, HuR si localizza prevalentemente a livello nucleare in entrambe le linee cellulari. Viene inoltre confermata l'over-espressione di HuR nelle BCPAP rispetto alle cellule normali.

## Effetti del silenziamento di HuR

Data l'over-espressione di HuR nelle cellule tumorali e il suo possibile coinvolgimento nello sviluppo tumorale, in una seconda fase di questo studio siamo andati a valutare gli effetti biologici del silenziamento di HuR *in vitro*.

### Silenziamento della proteina HuR

Il silenziamento genico di HuR è stato effettuato trattando le Nthy-ori-3.1 e le BCPAP per 72 ore con tre diversi siRNA specifici per tre diverse sequenze presenti nel trascritto di

HuR (*siRNA1*, *siRNA2* e *siRNA3*) e con un oligonucleotide di controllo che ha come target una sequenza non presente nel genoma umano (control). Il livello di silenziamento è stato valutato a livello proteico mediante Western Blot (Figura 4).

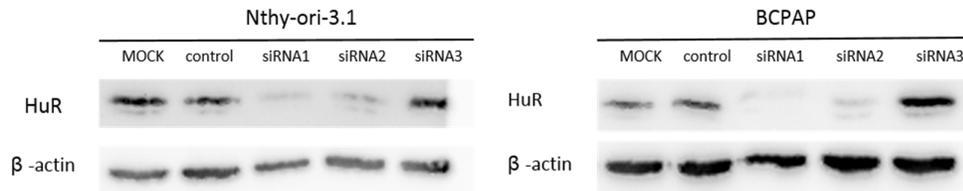


Figura 4. Valutazione, mediante Western Blot, dei livelli di HuR in seguito al silenziamento della proteina nelle due linee cellulari.

Il Western Blot ci ha permesso di determinare che il siRNA1 risulta essere quello più efficiente, in entrambe le linee, il siRNA2 ha un'efficacia leggermente minore mentre il siRNA 3 non sembra avere alcun effetto. Poichè utilizzando quest'ultimo siRNA non si osserva alcuna diminuzione dell'espressione di HuR, è stato deciso di non utilizzare questo oligonucleotide per le analisi successive.

### Effetti del silenziamento di HuR sulla vitalità cellulare

In diversi altri studi viene descritto come il silenziamento di HuR porti all'aumento dei fenomeni apoptotici e quindi alla morte cellulare (Filippova et al., 2011). Per questo motivo siamo andati a valutare se la soppressione dell'espressione di HuR avesse effetti sulla vitalità cellulare e l'apoptosi.

Per questo scopo è stato utilizzato il protocollo citofluorimetrico basato sulla colorazione con Annessina V (AnV) e Propidio Ioduro (PI) per valutare eventuali modifiche nel bilancio tra vitalità cellulare e apoptosi (Figura 5).

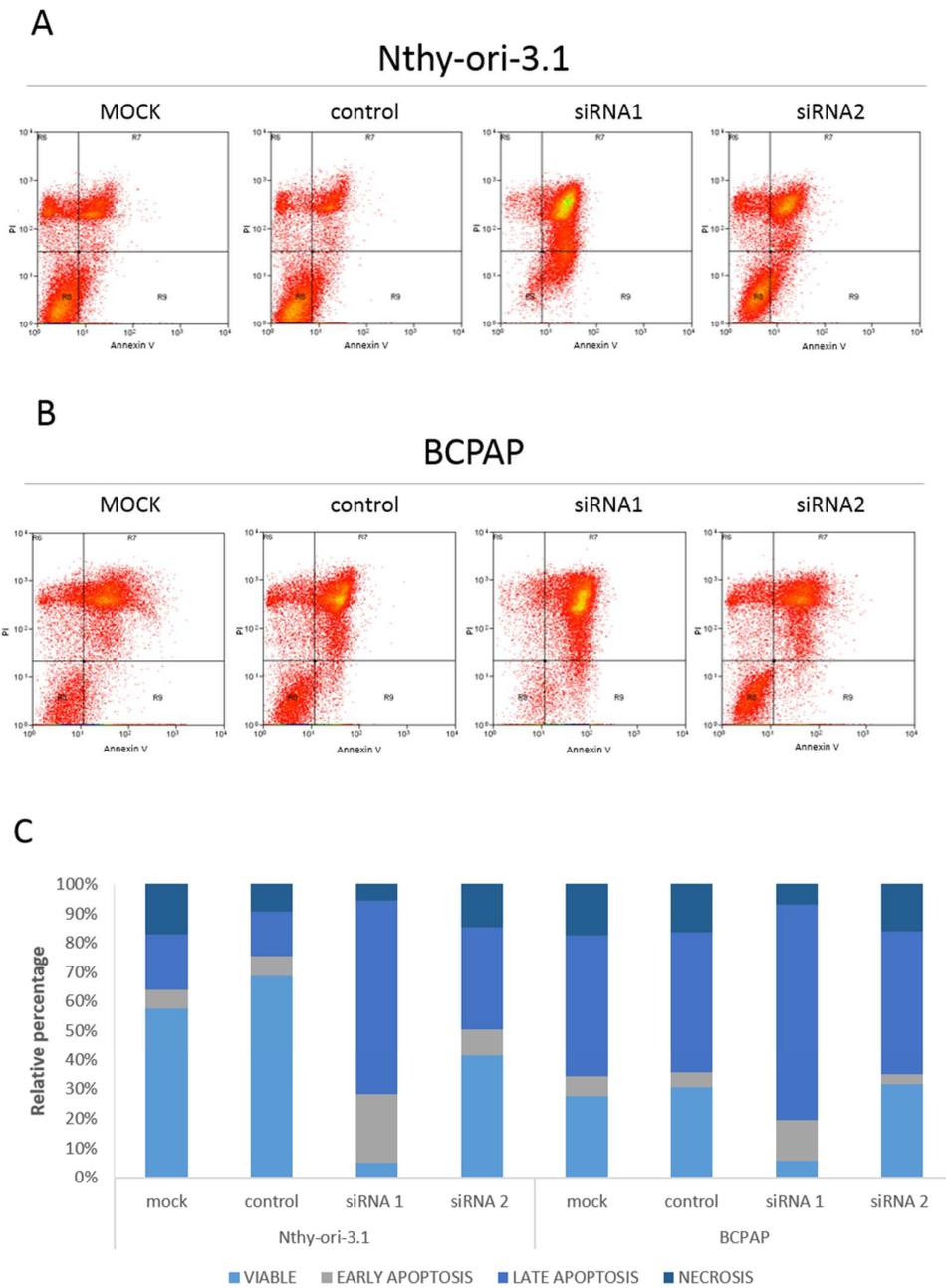


Figura 5. Effetti del silenziamento di HuR su vitalità ed apoptosi nelle linee cellulari Nthy-ori-3.1 (Pannello A) e BCPAP (Pannello B). Pannello C: grafico a barre delle percentuali relative di cellule vitali, apoptotiche e necrotiche nelle due linee cellulari.

La trasfezione per 72 ore con i siRNA HuR-specifici, alla concentrazione di 5 nM, porta ad un netto incremento dei processi apoptotici, in particolare con il siRNA1, ovvero quello che già mostrava un maggiore effetto nella riduzione dei livelli di proteina. In termini di vitalità cellulare, rispetto ai controlli, nelle Nthy-ori-3.1 vi è una riduzione di cellule vitali del 93% con il siRNA1, del 30% con il siRNA2. Nelle BCPAP la riduzione è dell'80% con il siRNA1, mentre con l'altro siRNA non si rilevano differenze rispetto al controllo.

In termini di morte cellulare, invece, nelle Nthy-ori-3.1 vi è un forte incremento dei processi apoptotici, sia precoci che tardivi, con il siRNA1, con un incremento di 3 volte rispetto al controllo, mentre con il siRNA2 l'incremento è di circa 2 volte. Nelle BCPAP solamente il siRNA1 porta ad un significativo incremento dell'apoptosi di circa 2.5 volte.

### Effetti molecolari del silenziamento di HuR

Dato il coinvolgimento di HuR nel controllo post-trascrizionale dell'espressione genica abbiamo voluto valutare gli effetti del silenziamento di HuR sul trascrittoma delle Nthy-ori-3.1 e delle BCPAP.

In collaborazione con l'Istituto di Genomica Applicata di Udine (IGA), ed in particolare con la dr.ssa Radovic, abbiamo effettuato il sequenziamento dell'RNA delle due linee cellulari tiroidee sottoposte a trasfezione per 72 ore con il siRNA1 alla concentrazione di 5 nM.

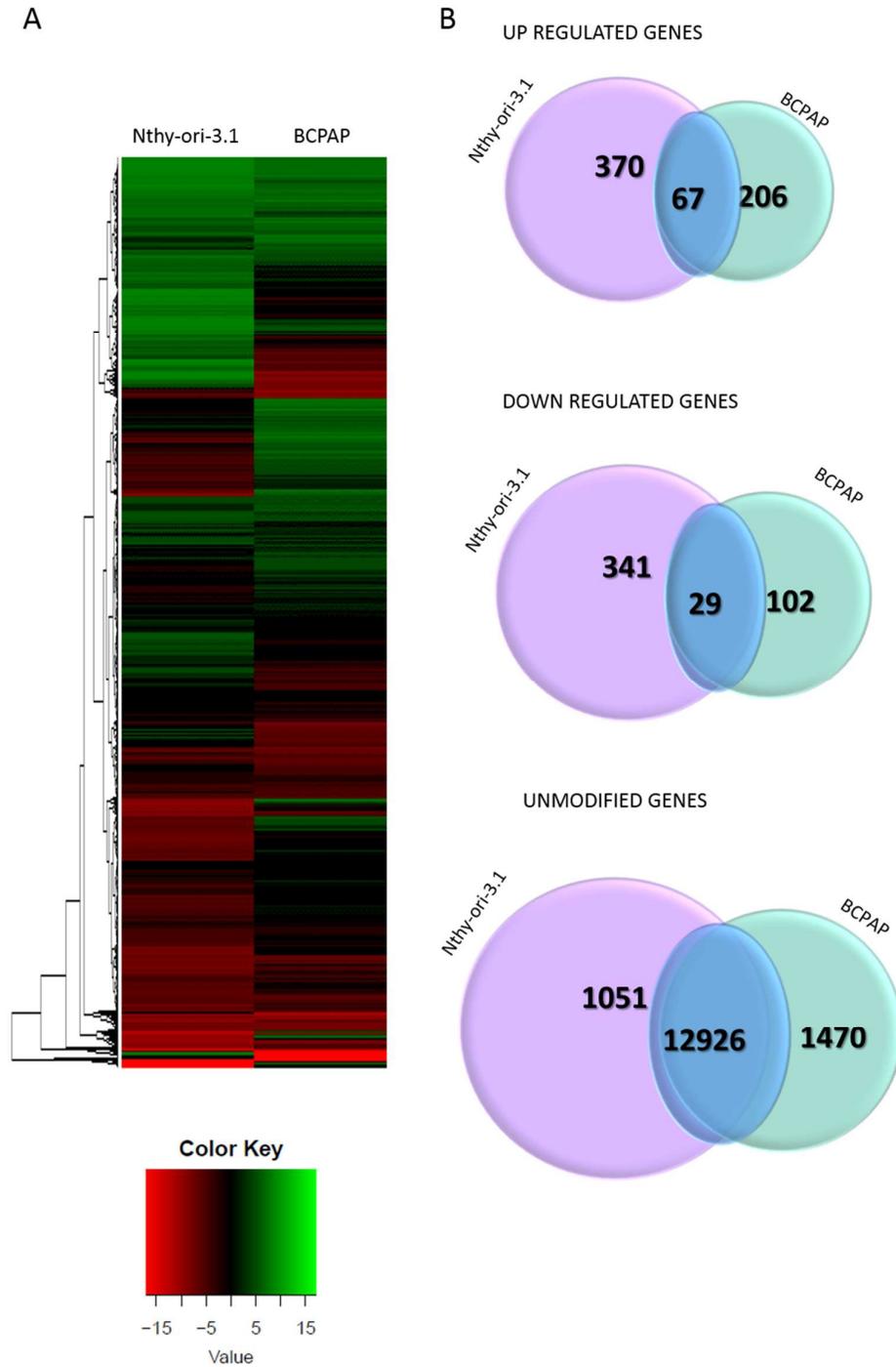


Figura 6. Effetti del silenziamento di HuR sul trascrittoma di Nthy-ori-3.1 e BCPAP. Pannello A: Heatmap relative ai profili di espressione genica ottenuti in seguito al silenziamento di HuR nelle due diverse linee Nthy-ori-3.1 e BCPAP. L'immagine ottenuta deriva dai dati, ottenuti mediante RNA-seq, normalizzati sul campione controllo negativo. In verde sono rappresentati i geni up-regolati e in rosso quelli down-regolati. Pannello B: Diagrammi di Venn rappresentanti il confronto degli effetti del silenziamento di HuR in Nthy-ori-3.1 e BCPAP dei geni up- e down-regolati e non modificati.

Come si può vedere nella Figura 6, il silenziamento di HuR modifica il profilo di espressione genica in entrambe le linee cellulari, in maniera diversa tra le due.

Nelle Nthy-ori-3.1 sono stati identificati un totale di 14784 trascritti, dei quali 13977 risultano essere non modificati dal silenziamento di HuR, mentre 437 sono up-regolati e 370, invece, down-regolati. Nelle BCPAP sono stati identificati 14800 trascritti, dei quali 14396 non vengono modificati dal silenziamento, 273 vengono up-regolati e 131 down-regolati. I geni, la cui espressione risulta essere modificata dal silenziamento di HuR possono quindi essere considerati come target funzionali di questa RBP.

Da questi dati possiamo assumere che tra queste due linee cellulari quella che risulta essere più sensibile al knockdown di HuR sono le Nthy-ori-3.1 e che globalmente l'effetto del silenziamento si risolve in un'up-regolazione dei livelli dei trascritti.

Al fine di vedere se gli effetti del silenziamento di HuR sui singoli geni fossero gli stessi nelle due linee, i dati ottenuti nelle Nthy-ori-3.1 e quelli delle BCPAP sono stati confrontati tra loro. In questo modo è stato possibile evidenziare come il silenziamento di HuR abbia effetti diversi nelle due linee cellulari. Infatti, dei 437 trascritti up-regolati nelle Nthy-ori-3.1, solo 67 vengono up-regolati anche nelle BCPAP, mentre dei 370 trascritti down-regolati nelle Nthy-ori-3.1 solo 29 lo sono anche nelle BCPAP. Inoltre, confrontando tra loro i trascritti che risultano essere non modificati dal silenziamento nelle due linee, si può osservare che 1051 e 1470 trascritti risultano essere inalterati esclusivamente nelle Nthy-ori-3.1 e nelle BCPAP, rispettivamente.

Nelle tabelle 1 e 2 vengono elencati i 20 geni che risultano essere maggiormente modificati dal silenziamento di HuR nelle due linee cellulari. Come si può vedere nelle tabelle i principali target funzionali di HuR sono trascritti non codificanti ed in particolare miRNA.

Tabella 1. I primi 20 trascritti down- e up-regolati nelle Nthy-ori-3.1 dal silenziamento di HuR.

TOP 20 Nthy-ori-3.1 down-regulated genes				TOP 20 Nthy-ori-3.1 up-regulated genes			
Gene	Control FPKM	siRNA FPKM	Fold change (log2)	Gene	Control FPKM	siRNA FPKM	Fold change (log2)
MIR103A2	26.53	0	Infinite	OR5H14	0	0.70	Infinite
MIR103B2	205.72	0	Infinite	ACKR1	0	1.19	Infinite
MIR1227	8.63	0	Infinite	MIR5193	0	1.35	Infinite
MIR1231	10.49	0	Infinite	PTGIR	0	1.39	Infinite
MIR1260B	12.48	0	Infinite	BAALCOS	0	1.48	Infinite
MIR1279	314.85	0	Infinite	CASC8	0	1.48	Infinite
MIR1304	11.15	0	Infinite	CTSE	0	1.79	Infinite
MIR1324	8.08	0	Infinite	FDCSP	0	2.03	Infinite
MIR15A	47.29	0	Infinite	MIR5572	0	2.08	Infinite
MIR181B2	12.28	0	Infinite	MIR548I2	0	2.75	Infinite
MIR191	13.06	0	Infinite	CCL4	0	4.53	Infinite
MIR192	5.77	0	Infinite	MIR1178	0	4.86	Infinite
MIR194-1	16.51	0	Infinite	SNORA16B	0	5.04	Infinite
MIR2278	14.21	0	Infinite	MIR1224	0	5.21	Infinite
MIR27B	10.30	0	Infinite	MIR492	0	5.58	Infinite
MIR302C	25.72	0	Infinite	MIR221	0	5.72	Infinite
MIR3176	43.99	0	Infinite	SNORA79	0	6.68	Infinite
MIR3190	22.54	0	Infinite	MIR577	0	7.14	Infinite
MIR3192	17.62	0	Infinite	MIR1207	0	7.28	Infinite
MIR320B2	2.41	0	Infinite	SNORA70B	0	7.43	Infinite

FPKM= Fragments Per Kilobase Of Exon Per Million Fragments Mapped

Tabella 2. I primi 20 trascritti down- e up-regolati nelle BCPAP dal silenziamento di HuR.

TOP 20 BCPAP down-regulated genes				TOP 20 BCPAP up-regulated genes			
Gene	Control FPKM	siRNA FPKM	Fold change (log2)	Gene	Control FPKM	siRNA FPKM	Fold change (log2)
SNORD98	32.08	0	Infinite	SNORA56	0	0.69	Infinite
RIIAD1	0.52	0	Infinite	MIR922	0	54.83	Infinite
MT1JP	0.53	0	Infinite	HIST1H4G	0	0.53	Infinite
CLDN3	0.56	0	Infinite	DDX26B	0	0.60	Infinite
PPP1R14A	0.61	0	Infinite	ZP4	0	0.61	Infinite
FAM25A	1.13	0	Infinite	KISS1	0	0.72	Infinite
MIR5572	1.78	0	Infinite	GNG8	0	1.24	Infinite
SNORA70	2.46	0	Infinite	IFNL2	0	1.24	Infinite
MIR98	3.20	0	Infinite	IFNB1	0	1.61	Infinite
MIR941-2	5.45	0	Infinite	MIR3689B	0	1.68	Infinite

<b>MIR765</b>	6.58	0	Infinite	<b>IFNL1</b>	0	2.12	Infinite
<b>MIR7110</b>	7.27	0	Infinite	<b>SCARNA11</b>	0	2.17	Infinite
<b>MIR569</b>	7.29	0	Infinite	<b>MIR6129</b>	0	3.32	Infinite
<b>MIR135A2</b>	7.66	0	Infinite	<b>MIR5191</b>	0	3.47	Infinite
<b>MIR10A</b>	7.72	0	Infinite	<b>MIR5193</b>	0	3.68	Infinite
<b>MIR567</b>	7.80	0	Infinite	<b>MIR5189</b>	0	3.71	Infinite
<b>MIR4441</b>	7.85	0	Infinite	<b>P2RX6P</b>	0	3.72	Infinite
<b>MIR6785</b>	7.87	0	Infinite	<b>MIR454</b>	0	4.07	Infinite
<b>SNORD23</b>	8.07	0	Infinite	<b>MIR182</b>	0	4.47	Infinite
<b>MIR345</b>	8.48	0	Infinite	<b>MIR3940</b>	0	4.58	Infinite

FPKM= Fragments Per Kilobase Of Exon Per Million Fragments Mapped.

Al fine di validare i dati, ottenuti dall'RNA-seq, mediante PCR quantitativa (Figura 7) abbiamo selezionato 12 geni che risultavano essere up-regolati o down-regolati in una o in entrambe le linee cellulari. Tali geni sono stati selezionati sia in base alla loro funzione biologica, sia in base al loro livello di over- o down-regolazione.

Tabella 3. Geni down- e up-regolati dal silenziamento di HuR nelle Nthy-ori-3.1 validati mediante qPCR.

Nthy-ori-3.1 down-regulated genes				Nthy-ori-3.1 up-regulated genes			
Gene	Control FPKM	siRNA FPKM	Fold change (log2)	Gene	Control FPKM	siRNA FPKM	Fold change (log2)
<b>PPL</b>	13.24	1.05	-3.66	<b>SERPINB2</b>	0.40	82.33	7.66
<b>LMOD1</b>	0.65	0.06	-3.32	<b>ROBO4</b>	0.04	0.95	4.58
<b>ITGB4</b>	8.13	1.72	-2.24	<b>PLAU</b>	39.45	347.16	3.14
<b>ARRB2</b>	23.70	5.91	-2.01	<b>ANGPTL4</b>	1.02	8.13	2.99

Tabella 4. Geni down- e up-regolati dal silenziamento di HuR nelle BCPAP validati mediante qPCR

BCPAP down-regulated genes				BCPAP up-regulated genes			
Gene	Control FPKM	siRNA FPKM	Fold change (log2)	Gene	Control FPKM	siRNA FPKM	Fold change (log2)
<b>PPL</b>	10.50	1.23	-3.09	<b>KISS1</b>	0	0.72	Inf
<b>ADIRF</b>	43.22	5.88	-2.87	<b>IFIT3</b>	22.01	252.81	3.52
<b>FGFBP1</b>	2.46	0.37	-2.70	<b>SERPINB2</b>	4.76	33.74	2.82
<b>ITGB4</b>	2.79	0.62	-2.16	<b>ANGPTL4</b>	4.15	18.34	2.14

Nelle Tabelle 3 e 4 si riportano i dati relativi all'RNA-seq dei geni che sono stati selezionati per ulteriori analisi. In breve, abbiamo deciso di focalizzare l'attenzione su:

- LMOD1 (Leiomodin 1 protein), la cui funzione molecolare non è ancora nota, risulta essere fisiologicamente over-espresso in tiroide, a livello oculare, nel muscolo scheletrico e nell'ovaio.
- ARRB2 (Arrestin  $\beta$ 2), associato alla desensibilizzazione dei recettori accoppiati alle proteine G con conseguente inibizione della risposta cellulare specifica a stimoli ormonali o mediati da neurotrasmettitori. Un recente studio ha dimostrato che ARRB2 è coinvolto nella multi-drug resistance nei gliomi (Chen et al., 2015).
- ADIRF (Adipogenesis Regulatory Factor), espresso esclusivamente nel tessuto adiposo dove promuove la differenziazione adipogenica e lo sviluppo cellulare. L'over-espressione di questo gene sembra essere associato allo sviluppo della resistenza farmacologica al cisplatino (Scott et al., 2009).
- FGFBP1 (fibroblast growth factor binding protein 1) codifica per un polipeptide carrier dedito al trasporto del fattore di crescita FGF. FGFBP1 gioca un ruolo critico nella proliferazione cellulare, nel differenziamento e nella migrazione, grazie al legame con i fattori di crescita dei fibroblasti.
- PPL (periplakin), una componente dei desmosomi: attraverso l'N-terminale interagisce con la membrana plasmatica, mentre l'estremità C-terminale è connessa ai filamenti intermedi del citoscheletro.
- ITGB4 (integrina  $\beta$ 4) implicato nell'adesione cellula-matrice e cellula-cellula e nella trasduzione del segnale per associazione con i recettori glicoproteici transmembrana; questa funzione è essenziale nella regolazione genica e nella crescita cellulare.
- PLAU (plasminogen activator, urokinase) coinvolto nella degradazione della matrice extracellulare.
- ROBO4 (roundabout guidance receptor 4), un recettore transmembrana per le proteine SLIT, presenti nel tessuto nervoso. Recentemente è stato dimostrato che

ROBO4 rappresenta un mediatore chiave nello sviluppo angiogenetico fisiopatologico mediato da SLIT-ROBO (Tian et al., 2015).

- KISS1 (KISS-1 Metastasis-Suppressor), un soppressore metastatico con azione nei melanomi maligni e in alcuni carcinomi mammari. KISS1, infatti, è una proteina che inibisce la chemotassi, l'invasione tumorale e di conseguenza lo sviluppo di metastasi.
- IFIT3 (interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats3), inibitore di processi cellulari quali migrazione, proliferazione e *signaling*.
- SERPINB2 (serin peptidase inhibitor, clade B(ovalbumin), member2), inibitore dell'urochinasasi uPA (urokinase-type plasminogen activator), detto anche PLAU.
- ANGPTL4 (angiopoietin-like 4), una proteina la cui espressione risulta essere indotta in seguito ad ipossia. Gioca diversi ruoli nella la regolazione dell'angiogenesi e la modulazione della tumorigenesi.

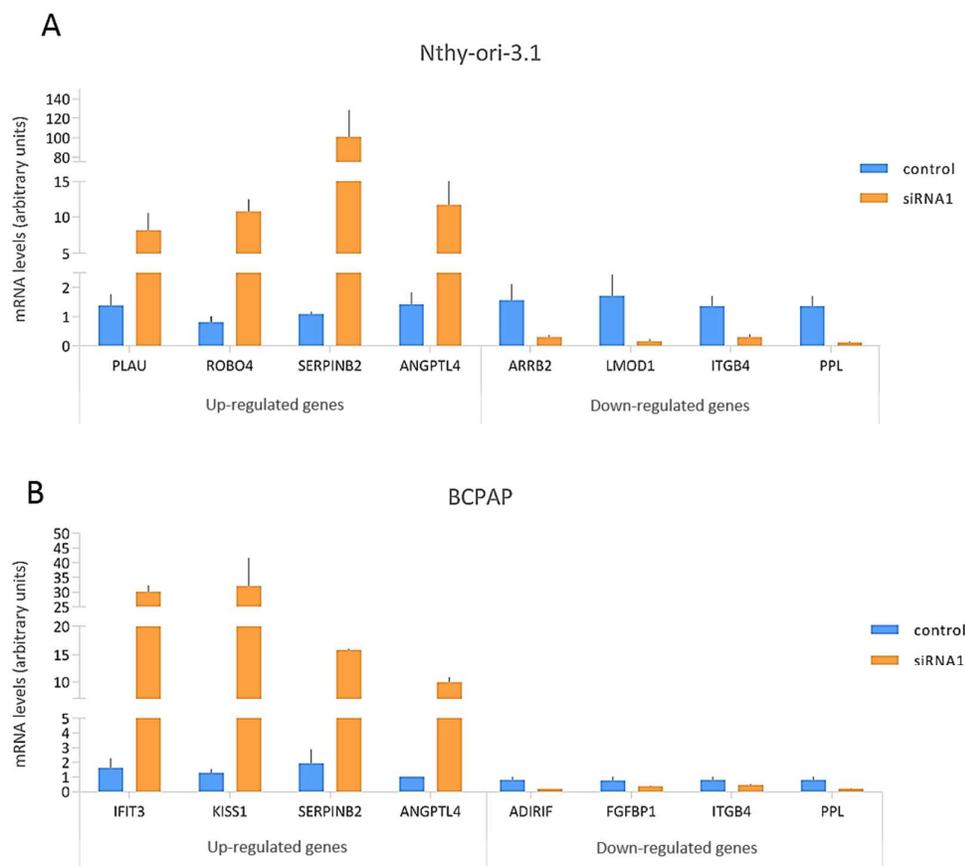


Figura 7. Quantizzazione relativa, eseguita in qPCR, dell'espressione dei geni selezionati nell'RNA-seq di Nthy-ori-3.1 e BCPAP. L'espressione relativa dei geni analizzati è stata calcolata con il metodo  $\Delta\Delta Ct$  attraverso il software SDS (Applied Biosystem). Tutti i geni analizzati risultano essere modificati dal silenziamento di HuR in maniera significativa (analisi statistica mediante t test).

Come riportato in Figura 7, i dati ottenuti con l'RNA-seq sono stati confermati mediante qPCR. In particolare, nelle Nthy-ori-3.1 abbiamo osservato un aumento dell'espressione dei geni up-regolati specifici per questa linea di 10 volte nel caso di PLAU e di 12 volte per ROBO4. Mentre per quanto riguarda gli specifici per le BCPAP, IFIT3 risulta essere aumentato di 32 volte e KISS1 di 22 volte. Nel caso dei geni down-regolati specifici per la linea tiroidea normale, si osserva una diminuzione di ARR2 di 4 volte e di LMOD1 di 12 volte. Mentre nella linea tumorale si verifica una diminuzione pari a 5 volte dell'espressione genica di ADIRIF e di 3 volte nel caso di FGFBP1. Per quanto riguarda, invece, i geni comunemente up-regolati in entrambe le linee si osserva un aumento di 128 volte nel caso di SERPINB2 nelle Nthy-ori-3.1 e di 16 volte nelle BCPAP. Mentre ANGPTL4

risulta essere aumentato di 17 volte nella linea non tumorigenica e di 10 volte in quella tumorale. I dati relativi ai geni comuni down-regolati mostrano ITGB4 diminuito di 4 volte nelle Nthy-ori-3.1 e di 2 volte nelle BCPAP; mentre la riduzione dell'espressione genica di PPL è pari a 12 volte nelle Nthy-ori-3.1 e di 4 volte nelle BCPAP.

## Analisi dei profili di legame di HuR

Al fine di capire se i diversi effetti del silenziamento di HuR nelle due linee cellulari Nthy-ori-3.1 e BCPAP fossero dovuti a diversi profili di legame di HuR con i suoi target, abbiamo effettuato l'immunoprecipitazione di HuR (RIP). L'immunoprecipitazione è stata analizzata mediante sequenziamento, in collaborazione con l'Istituto di Genomica Applicata di Udine.

Attraverso l'analisi della RIP-seq (Figura 8, Pannello A) è stato possibile identificare 846 trascritti legati da HuR nelle Nthy-ori-3.1, mentre nelle BCPAP i target d'interazione di HuR identificati sono 952.

Questa analisi ha permesso di evidenziare come i profili degli mRNA legati da HuR fossero differenti tra due linee. In particolare, sono stati identificati 572 target d'interazione di HuR in entrambe le linee, 274 trascritti legati in modo significativo solo nelle Nthy-ori-3.1 e 380 solo nelle BCPAP.

I target di HuR individuati sono stati suddivisi in 5 gruppi in base al loro Fold Change di arricchimento rispetto al controllo. Come descritto nel pannello B della Figura 8, il numero di geni per ciascuna categoria è comparabile tra le due linee.

Allo scopo di validare la bontà dei nostri risultati di RIP-seq, quest'ultimi sono stati comparati con BioGRID, una banca dati *open source* in cui sono archiviati i dati pubblicati relativi alle interazioni proteiche (<http://thebiogrid.org/>). È stato così possibile identificare una corrispondenza tra i nostri risultati sperimentali e la letteratura: una correlazione, del 51% nelle Nthy-ori-3.1 e del 46% nelle BCPAP. Tra i geni che sono risultati essere in

comune con la banca dati, sono presenti anche alcuni dei target di HuR già noti in letteratura in altri tessuti, come HuR stesso, eIF4E, BCL2, TP53, XIAP, MDM2, VHL, MYC.

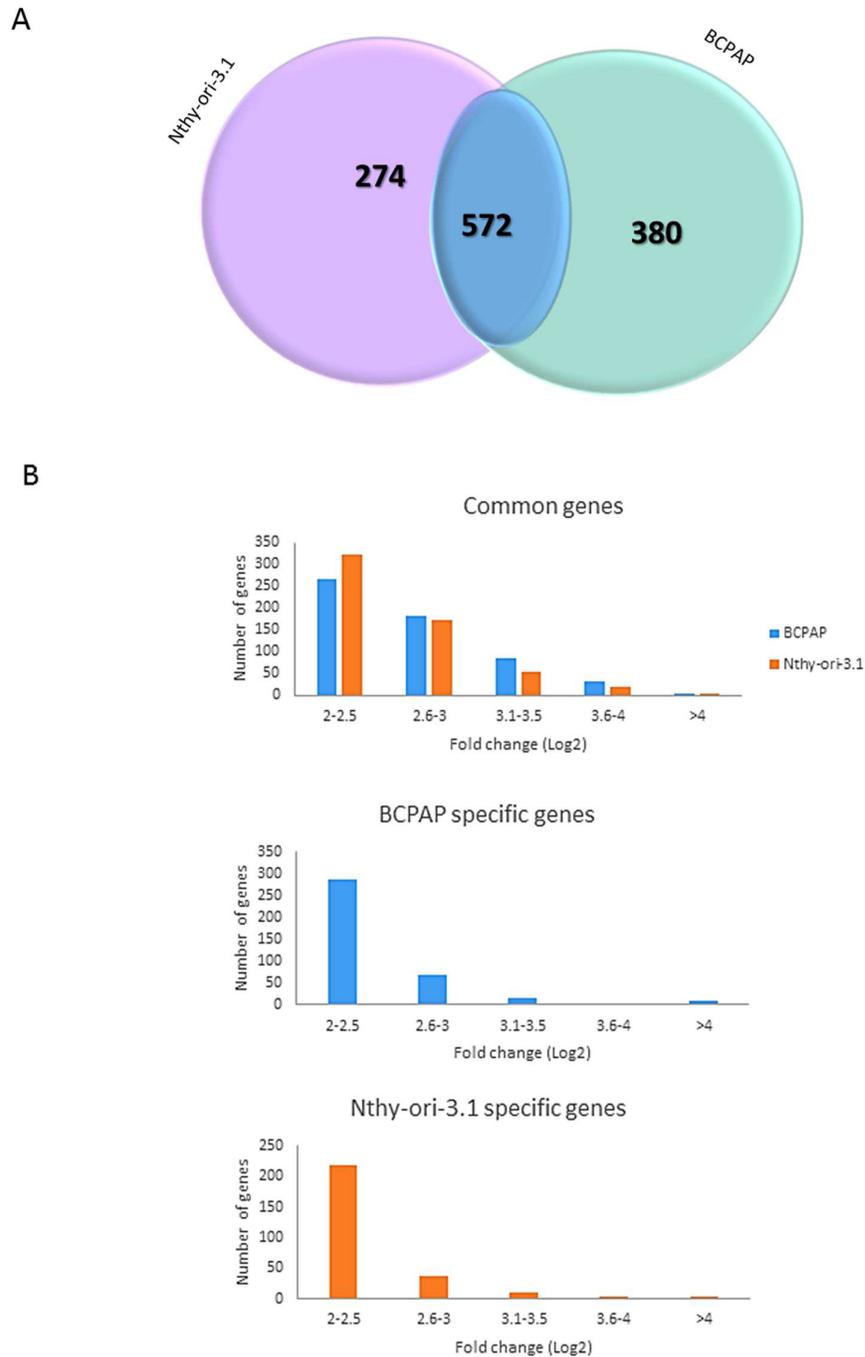


Figura 8. Analisi dei profili di legame di HuR mediante RIP-seq in Nthy-ori-3.1 e BCPAP. Pannello A: Diagrammi di Venn rappresentanti il confronto numerico dei trascritti significativamente legati da HuR nelle due linee cellulari Nthy-ori-3.1 e BCPAP identificati mediante RIP-seq. Pannello B: Suddivisione dei trascritti legati da HuR in base al loro livello di arricchimento (Fold Change) rispetto al controllo negativo (IgG).

A questo punto siamo andati a valutare a che livello del trascritto avvenisse il legame di HuR. Sono stati quindi analizzati i livelli di copertura delle conte ottenute con il sequenziamento e la loro localizzazione, per ogni singolo trascritto.

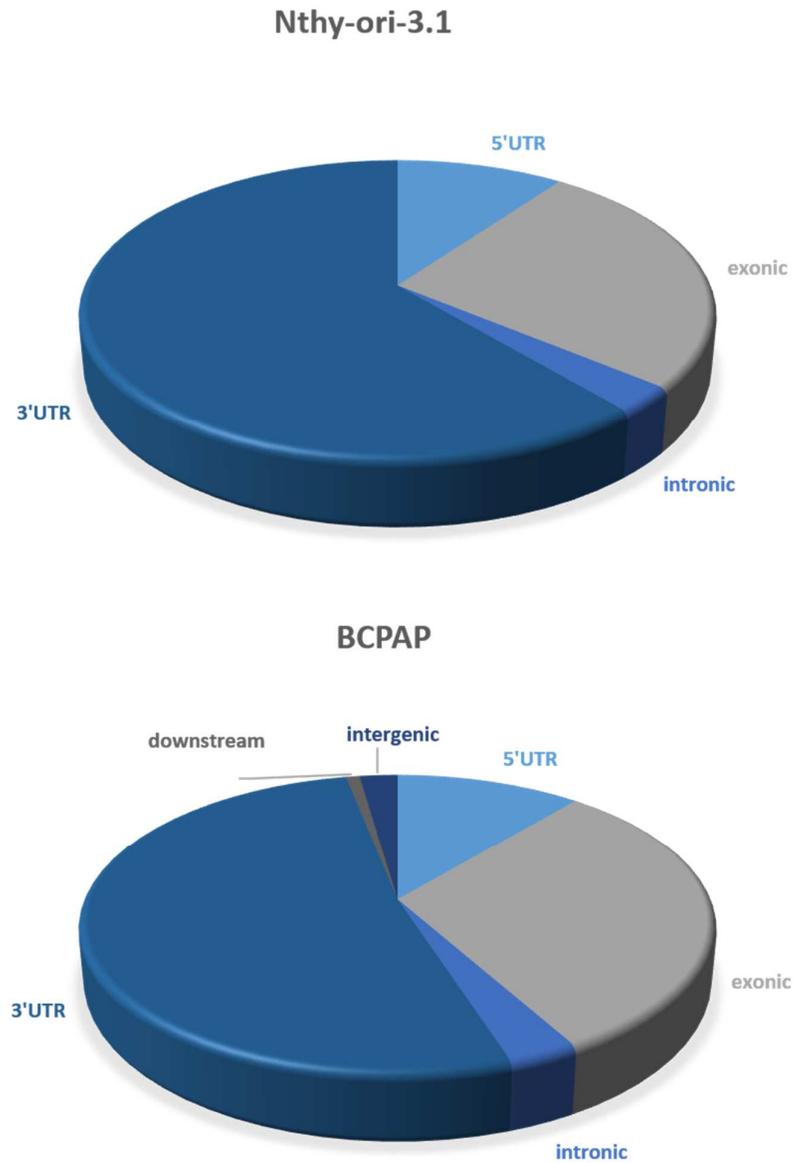


Figura 9. Localizzazione dei siti di interazione tra HuR e i suoi target.

In questo modo abbiamo dimostrato, confermando quanto già descritto in letteratura, che il legame di HuR ai suoi target avviene soprattutto a livello dell'estremità 3' UTR del

trascritto. Inoltre, nei trascritti in cui il legame avviene principalmente a livello del 3' UTR, la seconda maggiore copertura si rileva, nel 75% dei casi, a livello dell'esone adiacente. Allo scopo di identificare quali tra gli mRNA legati da HuR (target d'interazione) risultassero essere anche modificati dal suo silenziamento (target funzionali), i dati ottenuti dalla trascrittomica e dalla RIP-seq sono stati confrontati tra loro.

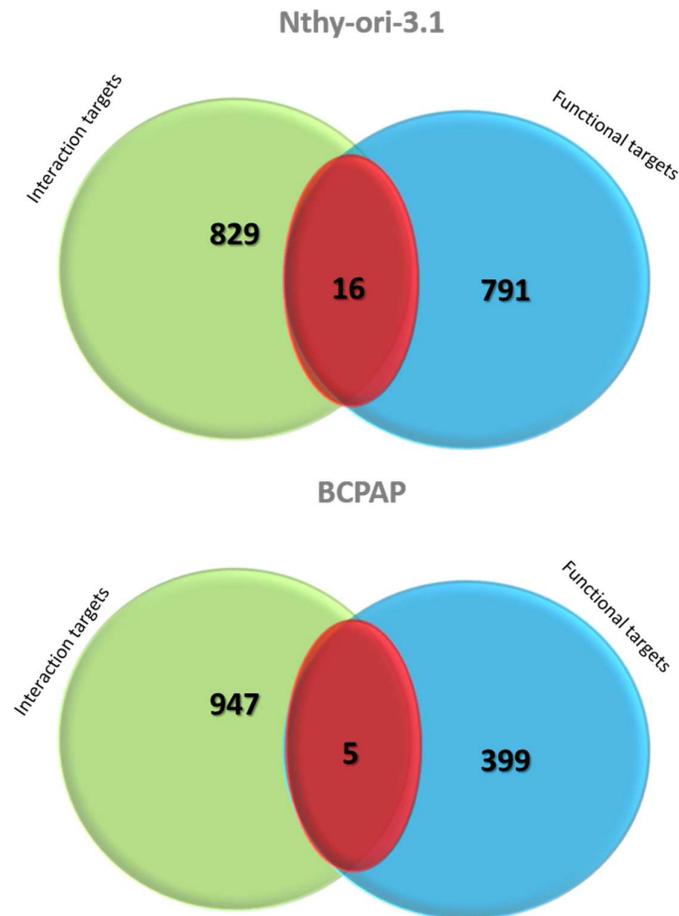


Figura 10. Diagrammi di Venn rappresentanti il confronto dei dati ottenuti mediante RNA-Seq (Functional targets in verde) e RIP-Seq (Interaction targets in azzurro). In rosso i geni che risultano essere sia target funzionali che d'interazione di HuR.

Come rappresentato nei diagrammi di Venn della Figura 10, il confronto dai dati di RNA-seq e di RIP-seq ha evidenziato come, tra gli 807 target funzionali di HuR e gli 845 target d'interazioni identificati nelle Nthy-ori-3.1, solo 16 siano sia targets funzionali che d'interazione. Nelle BCPAP, invece, confrontando i 404 geni legati da HuR e i 952 target funzionali, sono 5 i geni che risultano ad appartenere ad entrambe le categorie di targets.

## Analisi modificazioni post-traduzionali di HuR

Al fine di verificare se i diversi effetti del silenziamento di HuR e i diversi profili di legame agli mRNA target, osservati mediante RNA-seq e RIP-seq, fossero dovuti a un diverso *pattern* di modifiche post-traduzionali nelle due linee, abbiamo effettuato un'analisi elettroforetica bidimensionale, in collaborazione con il dr. Vascotto dell'Università di Udine.

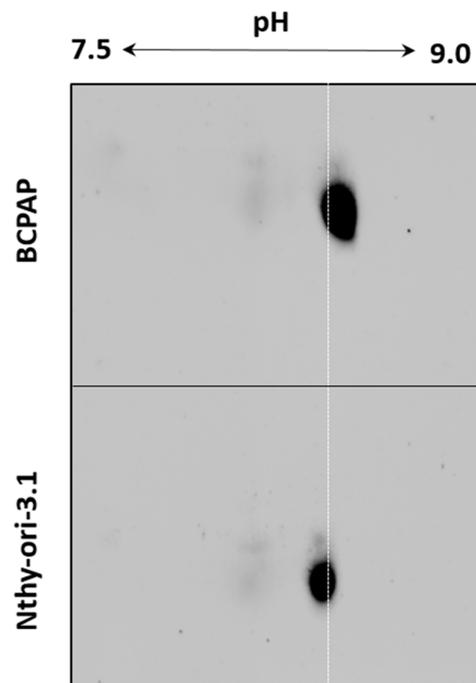


Figura 11. Analisi elettroforetica bidimensionale della proteina HuR in Nthy-ori-3.1 e BCPAP.

I risultati ottenuti con l'analisi 2-DE (Fig. 11) ci hanno permesso di determinare che il pI teorico della proteina HuR, calcolato ad un pH di 9.23, sperimentalmente si localizza intorno ad un pH di 8.6.

Inoltre è stato dimostrato che nelle due linee cellulari la proteina HuR presenta punti di isoelettrofocalizzazione leggermente differenti. Tale differenza potrebbe essere dovuta ad una differenza, nella tipologia e nel numero, nelle modifiche post-traduzionali a carico di HuR tra la linea tumorale e quella normale.

## DISCUSSIONE

Uno dei principali meccanismi di regolazione dell'espressione genica, processo fondamentale attraverso il quale le cellule rispondono a cambiamenti del loro microambiente, avviene a livello post-trascrizionale, coinvolgendo l'RNA.

La regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica può generare un diverso numero di prodotti proteici a partire da un singolo gene attraverso fenomeni nucleari di *splicing* alternativo, poliadenilazione su siti alternativi, editing dell'RNA; mentre nel citoplasma l'uso di siti alternativi d'inizio della traduzione permette la produzione di proteine funzionalmente differenti da un singolo mRNA (Siomi, et al., 1997). Un ulteriore controllo dell'espressione genica a livello citoplasmatico è dato dalla regolazione della stabilità e della traduzione dell'mRNA attraverso meccanismi di *RNA interference* (ad esempio siRNA e microRNA) o mediante l'azione delle RNA binding proteins (RBPs) (Trojanowicz, et al., 2011).

La rilevanza di tutti questi fenomeni nel controllo dell'espressione genica è crescente. Attraverso la misura simultanea dei livelli di mRNA e dei relativi prodotti proteici, è stato dimostrato che la quantità di proteine presenti nella cellula è prevalentemente controllata a livello della traduzione (Schwanhäusser et al., 2011).

Le RNA binding proteins sono una famiglia di proteine in grado di legare l'RNA formando complessi ribonucleoproteici (RNPs) (Glisovic et al., 2008; Lunde et al., 2007). Le RBPs sono caratterizzate da un'elevatissima specificità di legame con i loro RNA target attraverso il riconoscimento di una sequenza specifica e di strutture secondarie, da parte di uno o più domini proteici (Lunde et al., 2007).

La prima interazione tra RBPs ed RNA avviene durante la trascrizione del messaggero e, in alcuni casi, permane fino a quando la proteina non viene degradata; in altri casi il legame proteina-RNA è solamente di tipo transitorio e coinvolto nel controllo di eventi quali lo *splicing*, la maturazione, il trasposto e la localizzazione dell'RNA (Stefl et al., 2005).

Poiché le RNA binding protein ricoprono un ruolo fondamentale per la cellula, appare evidente che mutazioni che ne alterino l'attività o che modifichino i loro mRNA target, possano essere deleterie per il controllo dell'espressione genica e che ciò possa portare allo sviluppo di diverse patologie, tra cui il cancro (Kechavarzi e Janga, 2014; Wurth e Gebauer, 2014).

La proteina HuR è un membro della famiglia delle *human embryonic lethal abnormal vision* (ELAV) ed è una delle principali RBPs note per il loro coinvolgimento nella tumorigenesi (Abdelmhsen et al., 2011; Wurth, 2012). HuR, infatti, agisce come un potente promotore della proliferazione e della sopravvivenza cellulare; inoltre, stabilizzando gli mRNA codificanti per proteine coinvolte nell'invasività tumorale o nell'angiogenesi, potrebbe ricoprire un ruolo importante nella tumorigenesi. Inoltre, in letteratura, è largamente descritto come questa RPB, risulti essere over-espressa in numerose tipologie di cancro, come ad esempio il carcinoma gastrico, mammario, ovarico, renale, del colon-retto, del polmone, della pelle e il mesotelioma (Wang et al., 2013). Tuttavia, ad oggi, non sono presenti dati che descrivano l'espressione di HuR e il suo coinvolgimento nella tumorigenesi tiroidea.

Il carcinoma tiroideo rappresenta l'1-2% di tutti i tumori umani, ma costituisce la neoplasia endocrina più frequente (Carlomagno and Santoro, 2011). Esistono diverse tipologie di carcinoma tiroideo, le quali vengono classificate in base al tipo cellulare da cui origina la lesione neoplastica. Poiché il tumore tiroideo all'esordio spesso non si manifesta con una sintomatologia conclamata, è difficile effettuarne una diagnosi precoce, mentre è assai più frequente che la diagnosi avvenga durante l'esecuzione di analisi per altre patologie. Ad oggi, l'unica terapia in uso per il carcinoma tiroideo, è l'asportazione della ghiandola, con un successivo ciclo di radioterapia e terapia ormonale soppressiva. Negli ultimi anni, l'identificazione di mutazioni geniche e riarrangiamenti cromosomici ha permesso di definire meglio le caratteristiche biologiche dei tumori tiroidei, e testare nuove terapie a bersaglio molecolare. Oggigiorno, infatti, la ricerca di marker molecolari, sia diagnostici

che terapeutici, in campo oncologico, ed in particolare in ambito tumorale tiroideo, risulta essere di estrema rilevanza poiché, nonostante i carcinomi tiroidei siano prevalentemente differenziati e dunque ad aggressività limitata, tra questi vi è una frazione del 5-10% circa, caratterizzata da una forte aggressività, per la quale attualmente non sono presenti marker molecolari o morfologici che permettano di distinguerli (Lloyd et al., 2011).

Il mio progetto di dottorato si è quindi posto l'obiettivo di studiare l'espressione e la funzione dell'RNA binding protein HuR nel tumore tiroideo. Abbiamo quindi dimostrato come, sia *in vivo* che *in vitro*, ci sia un aumento dell'espressione di HuR nei carcinomi tiroidei rispetto alla ghiandola sana, ed in particolare nei carcinomi papilliferi. Inoltre, all'over-espressione di HuR si associa, come già descritto per altre neoplasie, un aumento della frazione citoplasmatica dell'RBP (Govindaraju and Lee, 2013).

L'over-espressione di HuR nelle neoplasie tiroidee potrebbe essere dovuta all'alterazione delle vie di segnalazione di PI3K-Akt e di NF- $\kappa$ B, note per il loro coinvolgimento nella tumorigenesi tiroidea (Pacífico F, et al. 2004; Saji e Ringel, 2010; Xing, 2010), in quanto questi risultano essere implicati nell'attivazione della trascrizione del gene *ELAVL1* (Kang et al., 2008; Govindaraju e Lee, 2013).

L'over-espressione e la delocalizzazione citoplasmatica della proteina HuR, quindi, candidano questa RBP come possibile marker molecolare diagnostico anche nel carcinoma tiroideo.

Considerata l'importanza di HuR nella tumorigenesi di molte tipologie di cancro e la sua over-espressione nel carcinoma tiroideo, abbiamo voluto indagare quali fossero gli effetti biologici del silenziamento di HuR, in particolare sulla vitalità cellulare e sull'espressione genica. A questo scopo abbiamo selezionato due linee cellulari tiroidee: una linea normale (Nthy-ori-3.1) e una derivata da PTC (BCPAP).

Mediante la tecnica dell'RNA *interference*, abbiamo osservato che il silenziamento dell'espressione di HuR, nelle due linee tiroidee analizzate, porta ad una drastica riduzione della vitalità cellulare per aumento dei processi apoptotici. Questo risultato trova anche

riscontro in altri studi presenti in letteratura (Filippova et al., 2011). Poiché HuR risulta coinvolto nella regolazione di molti trascritti con funzione anti-apoptotica, tra cui *BCL2*, i risultati ottenuti sembrano essere coerenti con questo suo ruolo.

Considerato l'importanza di HuR nella regolazione dell'espressione genica a livello post-trascrizionale, siamo andati a valutare gli effetti del suo silenziamento sul trascrittoma di Nthy-ori-3.1 e BCPAP, mediante un'analisi di RNA-seq. I dati ottenuti ci hanno consentito di porre in evidenza come gli effetti del silenziamento di HuR siano diversi nelle due linee, con solo 98 e 29 geni comunemente up- e down-regolati, rispettivamente. Un'analisi più approfondita dei dati di RNA-seq ha permesso di determinare come la classe di geni che subisce maggiormente gli effetti del silenziamento, sia quella dei trascritti non codificanti, in particolare miRNA. Questo risulta essere in accordo con l'ipotesi della presenza di competizione e/o collaborazione tra miRNA e RBPs. Ad esempio, il miR-122 risulta avere un effetto antagonista sulla stabilizzazione dei target di HuR; viceversa let-7 è il grado di cooperare con questa RBP. L'espressione alterata dei miRNA nei profili di trascrittomica analizzati risulta essere, quindi, motivata dal ruolo che queste piccole molecole ricoprono nella regolazione post-trascrizionale.

Visti i diversi effetti del silenziamento di HuR sull'espressione genica delle due linee cellulari, abbiamo voluto analizzare, mediante RIP-seq, i profili di legame di HuR con i suoi mRNA target nelle due linee, al fine di verificare la possibile cellulo-specificità di HuR. Anche in questo caso abbiamo dimostrato l'esistenza di un diverso comportamento di HuR nelle due linee cellulari analizzate. In particolare abbiamo identificato 274 e 380 trascritti legati in modo significativo rispettivamente solo nelle Nthy-ori-3.1 e nelle BCPAP. Con questi risultati abbiamo confermato sperimentalmente quanto già ipotizzato da Terasintana e colleghi, ovvero una cellulo-specificità del legame HuR ai suoi target (Terasintana et al., 2015).

Sorprendentemente, confrontando i profili di legame di HuR all'mRNA nelle Nthy-ori-3.1 e nelle BCPAP (i target d'interazione), con i trascritti che risultano essere influenzati dal

suo silenziamento (i target funzionali), abbiamo rilevato che la maggior parte dei target d'interazione di HuR, identificati mediante RIP-seq, non subiscono alcuna variazione di espressione in assenza della RBP. Alla luce di quanto appena detto, l'effetto del silenziamento di HuR sull'espressione dei miRNA assume un significato ancora più importante. Considerato il ruolo dei miRNA come co-attori o antagonisti dell'azione di HuR, è possibile ipotizzare che la cellula sia in grado di mettere in atto un programma alternativo di espressione genica per far fronte all'assenza di HuR, attraverso un aumento dell'espressione dei suoi co-attori e la repressione dei suoi antagonisti.

La diversità nei profili di legame di HuR ai suoi target e nella risposta al silenziamento di questa RBP tra le due linee Nthy-ori-3.1 e BCPAP, potrebbe essere dovuta alla presenza, nella linea tumorale, di modifiche post-traduzionali a carico della proteina HuR diverse da quelle presenti nella linea normale. Attraverso un'analisi elettroforetica bidimensionale, infatti, abbiamo osservato due diverse forme di HuR nelle due linee Nthy-ori-3.1 e BCPAP. Dai risultati ottenuti possiamo ipotizzare che le due forme differiscano tra loro di una o più modifiche post-traduzionali. Poiché, come è noto in letteratura, la proteina subisce diverse modificazioni post-traduzionali, tra cui fosforilazioni e metilazioni, una delle prospettive future di questo lavoro prevede l'identificazione, mediante spettrometria di massa, della o delle modifiche post-traduzionali che la proteina presenta.

Un altro possibile fenomeno, in grado di influenzare il legame di HuR ai suoi target e che quindi potrebbe determinare la cellulo-specificità di questa RBP, è la presenza di diverse modificazioni post-trascrizionali a livello dell'RNA; ad oggi, infatti, sono state identificate più di 100 diverse modifiche post-trascrizionali a carico dell'RNA. La presenza di queste modifiche sull'RNA ha portato alla luce l'idea che queste possano agire come marker epigenetici, così come accade con la metilazione del DNA e le modifiche istoniche (He et al., 2010). La modifica dell'RNA più frequente è la N<sup>6</sup>-metil-adenosina (m<sup>6</sup>A); infatti, è possibile riscontrare questa particolare modifica in media almeno tre volte per singola molecola di mRNA, ed in particolare a livello del 3' UTR (Liu e Pan, 2015). Wang e colleghi

hanno inoltre dimostrato che HuR è in grado di regolare la stabilità di diversi mRNA in modo m<sup>6</sup>A-dipendente. In particolare, nel lavoro di Wang viene descritto come la riduzione e la perdita della metilazione della m<sup>6</sup>A incrementi le capacità di legame di HuR all'mRNA demetilato (Wang et al., 2014).

In conclusione questo studio ha permesso un'iniziale comprensione dell'espressione e del ruolo di HuR nel carcinoma tiroideo. Abbiamo inoltre dimostrato, sia attraverso esperimenti di RNA *interference*, sia attraverso lo studio dei profili di legame dell'RBP, la cellulo-specificità di HuR. Seguiranno ulteriori analisi su un più ampio numero di linee cellulari tumorali tiroidee e su tessuti, al fine di definire se i diversi effetti di HuR descritti in questa tesi siano imputabili a una cellulo-specificità della proteina o a tumore-specificità.

## BIBLIOGRAFIA

Abdelmohsen K, Pullmann R Jr, Lal A, Kim HH, Galban S, Yang X, Blethrow JD, Walker M, Shubert J, Gillespie DA, Furneaux H, Gorospe M. Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression. *Molecular Cell*. 2007; 25: 543-57

Abdelmohsen K, Srikantan S, Kuwano Y, Gorospe M. miR-519 reduces cell proliferation by lowering RNA-binding protein HuR levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 2008; 105: 20297-302. doi: 10.1073/pnas.0809376106

Abdelmohsen K, Gorospe M. Post-transcriptional regulation of cancer traits by HuR. *Wiley Interdisciplinary Reviews – RNA*. 2010; 1: 214-29. doi: 10.1002/wrna.4

Abdelmohsen K, Kim MM, Srikantan S, Mercken EM, Brennan SE, Wilson GM, Cabo Rd, Gorospe M. miR-519 suppresses tumor growth by reducing HuR levels. *Cell Cycle*. 2010; 9: 1354-9

Abdelmohsen K and Gorospe M. Post-transcriptional regulation of cancer traits by HuR. *Wiley interdisciplinary reviews – RNA*. 2011; 1: 214-29. doi: 10.1002/wrna.4

Abdelmohsen K. Modulation of Gene expression by RNA binding proteins: mRNA stability and translation. *Binding Protein, Kotb Abdelmohsen (Ed.)*. 2012; ISBN: 978-953-51-0758-3. doi: 10.5772/484852012

Adeniran AJ1, Zhu Z, Gandhi M, Steward DL, Fidler JP, Giordano TJ, Biddinger PW, Nikiforov YE. Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *American Journal of Surgery Pathology*. 2006; 30: 216-22

Al-Ahmadi W, Al-Ghamdi M, Al-Haj L, Al-Saif M, Khabar KS. Alternative polyadenylation variants of the RNA binding protein, HuR: abundance, role of AU-rich elements and auto-regulation. *Nucleic Acids Research*. 2009; 37: 3612-24. doi: 10.1093/nar/gkp223

Ayupova DA, Singh M, Leonard EC, Basile DP, Lee BS. Expression of the RNA-stabilizing protein HuR in ischemia-reperfusion injury of rat kidney. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2009; 297: F95-F105. doi: 10.1152/ajprenal.90632.2008

Baldan F, Mio C, Allegri L, Puppini C, Russo D, Filetti S, Damante G. Synergy between HDAC and PARP Inhibitors on Proliferation of a Human Anaplastic Thyroid Cancer-Derived Cell

Line. International Journal of Endocrinology. 2015; 2015: 978371. doi: 10.1155/2015/978371

Basolo F, Giannini R, Monaco C, Melillo RM, Carlomagno F, Pancrazi M, Salvatore G, Chiappetta G, Pacini F, Elisei R, Miccoli P, Pinchera A, Fusco A, Santoro M. Potent mitogenicity of the RET/PTC3 oncogene correlates with its prevalence in tall-cell variant of papillary thyroid carcinoma. American Journal of Pathology. 2002; 160: 247-54

Bassell GJ and Warren ST. Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function. Neuron. 2008; 60: 201-14. doi: 10.1016/j.neuron.2008.10.004

Brennan CM and Steitz JA. HuR and mRNA stability. Cellular and Molecular Life Sciences. 2001; 58: 266-277

Brown RL, de Souza JA, Cohen EEW. Thyroid Cancer: burden of illness and management of disease. Journal of Cancer. 2011; 2: 193-199

Campos AR, Grossman D and White K. Mutant alleles at the locus *elav* in *Drosophila melanogaster* lead to nervous system defects. A developmental-genetic analysis. Journal of Neurogenetic. 1985; 2: 197-218

Carlomagno F, Santoro M. A roadmap for targeted therapies. Nature Reviews Endocrinology 2011; 7: 65-67.

Chen CY and Shyu AB. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. Trends in Biochemical Sciences. 1995; 20: 465-470

Chen J., Xu ZY. & Wang F. "Association between DNA methylation and multidrug resistance in human glioma SHG-44 cells." Molecular Medicine Reports, 2015 vol 11(1): 43-52

Cléry A, Blatter M and Allain FH. RNA recognition motifs: boring? Not quite. Current Opinion Structural Biology. 2008; 18: 290-8. doi: 10.1016/j.sbi.2008.04.002

Cooper DL. Retention of CD44 introns in bladder cancer: understanding the alternative *splicing* of pre-mRNA opens new insights into the pathogenesis of human cancers. Journal of Pathology. 1995; 177: 1-3

Deryugina EI and Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. Cancer Metastasis Reviews. 2006; 25: 9-34

Durante C, Puxeddu E, Ferretti E, Morisi R, Moretti S, Bruno R, Barbi F, Avenia N, Scipioni A, Verrienti A, Tosi E, Cavaliere A, Gulino A, Filetti S, Russo D. BRAF mutations in papillary

thyroid carcinomas inhibit genes involved in iodine metabolism. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007; 92: 2840-3

Dynan WS, Tjian R. Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins. *Nature*. 1985; 316: 774-8

Elliott D and Lodomery M. *Molecular biology of RNA*. Oxford University Press, 2011.

Ezzat S, Zheng L, Kolenda J, Safarian A, Freeman JL, Asa SL. Prevalence of activating ras mutations in morphologically characterized thyroid nodules. *Thyroid*. 1996; 6: 409-416

Fallahi P, Mazzi V, Vita R, Ferrari SM, Materazzi G, Galleri D, Benvenga S, Miccoli P, Antonelli A. New therapies for dedifferentiated papillary thyroid cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015; 16: 6153-82. doi: 10.3390/ijms1603615

Fan XC and Steitz JA. HNS: A nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 1998; 95: 15293-15298

Filippova N, Yang X, Wang Y, Gillespie GY, Langford C, King PH, Wheeler C, Nabors LB. The RNA-binding protein HuR promotes glioma growth and treatment resistance. *Molecular Cancer Research*. 2011; 9: 648-59. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0325

Fusco A, Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, Pilotti S, Pierotti MA, Della Porta G, Vecchio G. A new oncogene in human thyroid papillary carcinomas and their lymph-nodal metastases. *Nature*. 1987; 328: 170-2

Glisovic T, Bachorik JL, Yong J, Dreyfuss G. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Letters*. 2008; 582: 1977-1986

Govindaraju S, Lee BS. Adaptive and maladaptive expression of the mRNA regulatory protein HuR. *World Journal of Biological Chemistry*. 2013; 4: 111-8. doi: 10.4331/wjbc.v4.i4.111

Gratacós FM and Brewer G. The role of AUF1 in regulated mRNA decay. *Wiley Interdisciplinary Reviews - RNA*. 2010; 1: 457-73. doi: 10.1002/wrna.26

Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, Melillo RM, Donghi R, Bongarzone I, Pierotti MA, Della Porta G, Fusco A, Vecchio G. PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell*. 1990; 60: 557-63

He C. Grand challenge commentary: RNA epigenetics? *Nature Chemical Biology*. 2010; 6: 863-865

- Heinonen M, Fagerholm R, Aaltonen K, Kilpivaara O, Aittomäki K, Blomqvist C, Heikkilä P, Haglund C, Nevanlinna H, Ristimäki A. Prognostic role of HuR in hereditary breast cancer. *Clinical Cancer Research*. 2007; 13: 6959-63
- Hinman MN and Lou H. Diverse molecular functions of Hu proteins. *Cellular and molecular life sciences*. 2008; 65: 3168-81. doi: 10.1007/s00018-008-8252-6
- Hsieh AC, Ruggero D. Targeting eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) in cancer. *Clinical Cancer Research*. 2010; 16: 4914-20. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0433
- Huttelmaier S, Zenklusen D, Lederer M, Dichtenberg J, Lorenz M, Meng X, Bassell GJ, Condeelis J, Singer RH. Spatial regulation of betaactin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature*. 2005; 438: 512–515
- Jhiang SM, Sagartz JE, Tong Q, Parker-Thornburg J, Capen CC, Cho JY, Xing S, Ledent C. Targeted expression of the ret/PTC1 oncogene induces papillary thyroid carcinomas. *Endocrinology*. 1996; 137: 375-8
- Kang MJ, Ryu BK, Lee MG, Han J, Lee JH, Ha TK, Byun DS, Chae KS, Lee BH, Chun HS, Lee KY, Kim HJ, Chi SG. NF-kappaB activates transcription of the RNA-binding factor HuR, via PI3K-AKT signaling, to promote gastric tumorigenesis. *Gastroenterology*. 2008; 135: 2030-42. doi: 10.1053/j.gastro.2008.08.009
- Karni R, de Stanchina E, Lowe SW, Sinha R, Mu D, Krainer AR. The gene encoding the *splicing* factor SF2/ASF is a proto-oncogene. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2007; 14: 185-93
- Kechavarzi B and Janga SC. Dissecting the expression landscape of RNA-binding proteins in human cancers. *Genome Biology*. 2014; 15: R14
- Keutgen XM; Filicori F; Fahey TJ III. Molecular Diagnosis for Indeterminate Thyroid Nodules on Fine Needle Aspiration. *Expert Review of Molecular Diagnostic*. 2013; 13: 613-623
- Kim HH, Abdelmohsen K, Lal A, Pullmann R Jr, Yang X, Galban S, Srikantan S, Martindale JL, Blethrow J, Shokat KM, Gorospe M. Nuclear HuR accumulation through phosphorylation by Cdk1. *Genes & Development*. 2008; 22: 1804-15. doi: 10.1101/gad.1645808

Kim HS, Wilce MC, Yoga YM, Pardini NR, Gunzburg MJ, Cowieson NP, Wilson GM, Williams BR, Gorospe M, Wilce JA. Different modes of interaction by TIAR and HuR with target RNA and DNA. *Nucleic Acids Research*. 2011; 39: 1117-30. doi: 10.1093/nar/gkq837

Kim MY, Hur J and Jeong S. Emerging roles of RNA and RNA-binding protein network in cancer cells. *BMB Reports* 2009; 42: 125-30

Kuwano Y, Pullmann R Jr, Marasa BS, Abdelmohsen K, Lee EK, Yang X, Martindale JL, Zhan M, Gorospe M. NF90 selectively represses the translation of target mRNAs bearing an AU-rich signature motif. *Nucleic Acids Research*. 2010; 38: 225-38. doi: 10.1093/nar/gkp861

Lafarga V, Cuadrado A, Lopez de Silanes I, Bengoechea R, Fernandez-Capetillo O, Nebreda AR. p38 Mitogen-activated protein kinase- and HuR-dependent stabilization of p21(Cip1) mRNA mediates the G(1)/S checkpoint. *Molecular and Cellular Biology*. 2009; 29:4341-51. doi: 10.1128/MCB.00210-09

Laroia G, Cuesta R, Brewer G, Schneider RJ. Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway. *Science*. 1999; 284: 499-502

Lebastchi AH and Callender GG. Thyroid cancer. *Current Problems in Cancer*. 2014; 38: 48-74. doi: 10.1016/j.currproblcancer.2014.04.001

Lebedeva S, Jens M, Theil K, Schwanhäusser B, Selbach M, Landthaler M, Rajewsky N. Transcriptome-wide analysis of regulatory interactions of the RNA-binding protein HuR. *Molecular Cell*. 2011; 43: 340-52. doi: 10.1016/j.molcel.2011.06.008

Liao B, Hu Y and Brewer G. Competitive binding of AUF1 and TIAR to MYC mRNA controls its translation. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2007; 14: 511-8

Liu N and Pan T. RNA epigenetics. *Translational Research*. 2015; 165: 28-35. doi: 10.1016/j.trsl.2014.04.003

Lloyd RC, Buehler D and Khanafshar E. Papillary Thyroid Carcinoma Variants. *Head and Neck Pathology*. 2011; vol 5: 51-56.

López de Silanes I, Lal A and Gorospe M. HuR: post-transcriptional paths to malignancy. *RNA Biology*. 2005; 2: 11-3

Lunde BM, Moore C and Varani G. RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007; 8: 479-490. doi: 10.1038/nrm2178

Luong QT, O'Kelly J, Braunstein GD, Hershman JM, Koeffler HP. Antitumor activity of suberoylanilide hydroxamic acid against thyroid cancer cell lines in vitro and in vivo. *Clinical Cancer Research*. 2006; 12: 5570-7

Ma WJ, Cheng S, Campbell C, Wright A, Furneaux H. Cloning and characterization of HuR, a ubiquitously expressed Elav-like protein. *The Journal of biological chemistry*. 1996; 271: 8144-51

Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*. 2011; 17: 10-12

Martini FH, Timmons MJ, Tallitsch RB. *Anatomia umana*. Edises 2000; pp. 513-515

Minvielle-Sebastia L and Keller W. mRNA polyadenylation and its coupling to other RNA processing reactions and to transcription. *Current Opinion in Cell Biology*. 1999; 11: 352-7

Molinaro M, Rizzoli C, Siracusa G, Stefanini M. *Istologia di V. Monesi*. IV ed. Piccin 1992; pp 489-490.

Motoi N, Sakamoto A, Yamochi T, Horiuchi H, Motoi T, Machinami R. Role of ras mutation in the progression of thyroid carcinoma of follicular epithelial origin. *Pathology Research Practice*. 2000; 196: 1-7

Nikiforov YE. Molecular Diagnostics of Thyroid Tumors. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2011; 135: 569-577

Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW et al. RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2003; 88: 2318-2326

Pacifico F, Mauro C, Barone C, Crescenzi E, Mellone S, Monaco M, Chiappetta G, Terrazzano G, Liguoro D, Vito P, Consiglio E, Formisano S, Leonardi A. Oncogenic and anti-apoptotic activity of NF- $\kappa$ B in human thyroid carcinomas. *Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279: 54610-54619

Paronetto MP, Cappellari M, Busà R, Pedrotti S, Vitali R, Comstock C, Hyslop T, Knudsen KE, Sette C. Alternative *splicing* of the cyclin D1 proto-oncogene is regulated by the RNA-binding protein Sam68. *Cancer Research*. 2010; 70: 229-239

- Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype *Nature reviews Cancer*. 2007; 7: 415–428
- Petz M, Them N, Huber H, Beug H, Mikulits W. La enhances IRES-mediated translation of laminin B1 during malignant epithelial to mesenchymal transition. *Nucleic Acids Research*. 2012; 40: 290–302
- Ptashne M. Regulation of transcription: from lambda to eukaryotes. *Trends Biochem Sci*. 2005; 30:275-9
- Ross MH and Pawlina W. *Istologia*. CEA editore. 2010; ISBN 9788808181022
- Saji M, Ringel MD. The PI3K-Akt-mTOR pathway in initiation and progression of thyroid tumors. *Molecular Cell Endocrinology*. 2010; 321:20–28
- Sanduja S, Blanco FF, Young LE, Kaza V, Dixon DA. The role of tristetraprolin in cancer and inflammation. *Frontiers in Bioscience*. 2012; 17: 174-88
- Sarkar S, Sinsimer KS, Foster RL, Brewer G, Pestka S. AUF1 isoform-specific regulation of anti-inflammatory IL10 expression in monocytes. *Journal of Interferon Cytokine Research*. 2008; 28: 679-91. doi: 10.1089/jir.2008.0028
- Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*. 2013; 495:126-7. doi: 10.1038/nature11848
- Scott BJ, Qutob S, Liu QY. and Nq CE. “APM2 is a novel mediator of cisplatin resistance in a variety of cancer cell types regardless of p53 or MMR status.” *International Journal of Cancer*, 2009; 125: 1193-204
- Shaw G and Kamen R. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mediates selective mRNA degradation. *Cell*. 1986; 46: 659-667
- Silvera D, Formenti SC, Schneider RJ. Translational control in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2010; 10: 254–266
- Siomi H and Dreyfuss G. RNA-binding proteins as regulators of gene expression. *Current Opinion in Genetics & Development*. 1997; 7: 345-353
- Sommer G, Dittmann J, Kuehnert J, Reumann K, Schwartz PE, Will H, Coulter BL, Smith MT, Heise T. The RNA-binding protein la contributes to cell proliferation and CCND1 expression. *Oncogene*. 2011; 30: 434–444

Srikantan S and Gorospe M. HuR function in disease. *Frontiers in Bioscience*. 2012; 17: 189–205

Stefl R, Skrisovska L and Allain FHT. RNA sequence- and shape-dependent recognition by proteins in the ribonucleoprotein particle. *EMBO Reports*. 2005; 6: 33–38. doi: 10.1038/sj.embor.7400325

Techasintana P, Davis JW, Gubin MM, Magee JD, Atasoy U. Transcriptomic-Wide Discovery of Direct and Indirect HuR RNA Targets in Activated CD4+ T Cells. *PLoS One*. 2015; 10: e0129321. doi: 10.1371/journal.pone.0129321

The Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated Genomic Characterization of Papillary Thyroid Carcinoma. *Cell*. 2015; 159: 676–690. Doi: 10.1016/j.cell.2014.09.050

Tian R, Liu ZX, Zhang H, Fang XX, Wang CG, Qi SN, Cheng Y and Su GF. Investigation of the Regulation of Roundabout4 (Robo4) by Hypoxia-inducible factor-1a in Microvascular Endothelial Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2015; 56: 2586-94. doi: 10.1167/iovs.14-14409

Trapnell C, Pachter L, and Salzberg SL. TopHat : discovering splice junctions with RNA-Seq.” *Bioinformatics*. 2009; 25: 1105–1111

Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, Pimentel H, Salzberg SL, Rinn JL, Pachter L. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols*. 2012; 7: 562–578.

Trapnell C, Hendrickson DG, Sauvageau M, Goff L, Rinn JL and Pachter L. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nature Biotechnology*. 2013; 31: 1–19

Treisman R. Transient accumulation of c-fos RNA following serum stimulation requires a conserved 5' element and c-fos 3' sequences. *Cell*. 1985; 42: 889-902

Trojanowicz B, Henning D, Dralle H, Hoang-Vu C. AUF1 and HuR: possible implications of mRNA stability in thyroid function and disorders. *Thyroid Research*. 2011; 4(Suppl 1): S5

Valacca C, Bonomi S, Buratti E, Pedrotti S, Baralle FE, Sette C, Ghigna C, Biamonti G. Sam68 regulates EMT through alternative *splicing*-activated nonsense-mediated mRNA decay of the SF2/ASF proto-oncogene. *The Journal of Cell Biology*. 2010; 191: 87-99. doi: 10.1083/jcb.201001073

- Vezi F, Del Fabbro C, Tomescu AI and Policriti A. rRNA : a fast and accurate short reads numerical aligner. *Bioinformatics*. 2012; 28: 123–124.
- Walter F. Boron, *Medical Physiology: A Cellular and Molecular Approach*, Elsevier/Saunders, 2003; p. 1300, ISBN 1-4160-2328-3
- Wang J, Guo Y, Chu H, Guan Y, Bi J, Wang B. Multiple functions of the RNA-binding protein HuR in cancer progression, treatment response and prognosis. *International Journal of molecular sciences*. 2013; 14: 10015-10041. doi: 10.3390/ijms140510015
- Wang Y, Li Y, Torth JI, Petrowski MD, Zhang Z, Zhao JC. N6-methyladenosine modification destabilizes developmental regulators in embryonic stem cells. *Nature Cell Biology*. 2014; 16: 191-198
- Wendel HG, Silva RL, Malina A, Mills JR, Zhu H, Ueda T, Watanabe-Fukunaga R, Fukunaga R, Teruya-Feldstein J, Pelletier J, Lowe SW. Dissecting eIF4E action in tumorigenesis. *Genes & Development*. 2007; 21: 3232-7
- Wilson T and Treisman R. Removal of poly(A) and consequent degradation of c-fos mRNA facilitated by 3' AU-rich sequences. *Nature*. 1988; 336: 396-399
- Wurth L. Versatility of RNA-Binding Proteins in Cancer. *Comparative and Functional Genomics*. 2012; 2012: 178525. doi: 10.1155/2012/178525
- Wurth L and Gebauer F. RNA-binding proteins, multifaced translational regulators in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2015; 1849: 881-6. doi: 10.1016/j.bbagr.2014.10.001
- Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocrine Related Cancer*. 2005; 12: 245–262
- Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocrine Reviews*. 2007; 28: 742–762
- Xing M. Genetic alterations in the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Thyroid*. 2010; 20: 697–706
- Zhou Z and Fu XD. Regulation of *splicing* by SR proteins and SR protein-specific kinases. *Chromosoma*. 2013; 22: 191-207

## PUBBLICAZIONI OTTENUTE DURANTE IL DOTTORATO

- **Baldan F**, Mio C, Allegri L, Conzatti K, Toffoletto B, Puppini C, Radovic S, Vascotto C, Russo D, Di Loreto C, Damante G. **HuR-bound RNA profiles in thyroid cell lines**. *Oncotarget*. 2015; *under revision*
- Rosignolo F, Sponziello M, Durante C, Puppini C, Mio C, **Baldan F**, Di Loreto C, Russo D, Filetti S, Damante G. **Expression of PAX8 target genes in papillary thyroid carcinoma**. *PlosONE*. 2016; *under revision*
- Mio C, Lavarone E, **Baldan F**, Toffoletto B, Puppini C, Filetti S, Durante C, Russo D, Orlacchio A, Di Cristofano A, Di Loreto C, Damante G. **MCM5 as a target of BET inhibitors in thyroid cancer cells**. *Endocrine Related Cancer*. 2015; doi: 10.1530/ERC-15-0322
- Allegri L, **Baldan F**, Mio C, Puppini C, Gucky T, Russo D, Kryštof V, Damante G. **Effects of BP-14, a novel Cyclin-Dependent Kinases inhibitor, on anaplastic thyroid cancer cells**. *Oncology Reports*. 2015; doi: 10.3892/or.2016.4614
- Dello Russo P, Franzoni A, **Baldan F**, Puppini C, De Maglio G, Pittini C, Cattarossi L, Pizzolitto S, Damante G. **A 16q deletion involving FOXF1 enhancer is associated to pulmonary capillary hemangiomatosis**. *BMC Medical Genetics*. 2015; 16:9. Doi: 10.1186/s12881-015-0241-7
- **Baldan F**, Mio C, Lavarone E, Di Loreto C, Puglisi F, Damante G, Puppini C. **Epigenetic bivalent marking is permissive to synergy of HDAC and PARP inhibitors on TXNIP expression in breast cancer cells**. *Oncology Reports*. 2015; 33:2199-206. doi: 10.3892/or.2015.3873
- **Baldan F**, Mio C, Allegri L, Puppini C, Russo D, Filetti S, Damante G. **Synergy between HDAC and PARP inhibitors on proliferation of a human anaplastic thyroid cancer-derived cell line**. *International Journal of Endocrinology*. 2015; Article ID 978371, 7 pages. doi:10.1155/2015/978371
- **Baldan F**, Lavarone E, Di Loreto C, Filetti S, Russo D, Damante G, Puppini C. **Histone post-translational modifications induced by histone deacetylase inhibition in transcriptional control units of NIS gene**. *Molecular Biology Reports*. 2014; 41:5257-65. doi: 10.1007/s11033-014-3397-x

- Puppini C, Durante C, Sponziello M, Verrienti A, Pecce V, Lavarone E, **Baldan F**, Campese AF, Boichard A, Lacroix L, Russo D, Filetti S, Damante G. **Overexpression of genes involved in miRNA biogenesis in medullary thyroid carcinomas with RET mutation**. *Endocrine*. 2014; doi: 10.1007/s12020-014-0204-3
- D'Agostino M, Sponziello M, Puppini C, Celano M, Maggisano V, **Baldan F**, Biffoni M, Bulotta S, Durante C, Filetti S, Damante G, Russo D. **Different expression of TSH receptor and NIS genes in thyroid cancer: role of epigenetics**. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2014; 52:121-31. doi: 10.1530/JME-13-0160