



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA
SCUOLA DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

**Corso di laurea magistrale in
BIOLOGIA MOLECOLARE E SANITARIA**

Anno Accademico 2021-2022

TESI DI LAUREA

*“Analisi dell’espressione dei microRNA
esosomiali rilasciati da cellule umane di
neuroblastoma SH-SY5Y che
sovraesprimono il gene LIN28B”*

Relatore: *Prof.ssa Silvia Viaggi*

Dott.ssa Alessandra Eva

Correlatore: *Prof.ssa Maria Paola Nitti*

Candidato: *Lorenzo Rombolà (4239787)*

INDICE

<u>1 ABSTRACT</u>	<u>4</u>
<u>2 INTRODUZIONE</u>	<u>6</u>
<u>2.1 Neuroblastoma</u>	<u>6</u>
<u>2.1.1 Stadiazione del tumore e terapia</u>	<u>7</u>
<u>2.1.2 Patologia del tumore</u>	<u>12</u>
<u>2.2 Genetica del Neuroblastoma</u>	<u>14</u>
<u>2.2.1 Neuroblastoma Familiare</u>	<u>14</u>
<u>2.2.2 Neuroblastoma Sporadico</u>	<u>16</u>
<u>2.2.3 Alterazioni genetiche e genomiche</u>	<u>16</u>
<u>2.3 Vescicole extracellulari</u>	<u>20</u>
<u>2.3.1 Esosomi</u>	<u>21</u>
<u>2.4 miRNA</u>	<u>22</u>
<u>2.4.1 Biogenesi</u>	<u>22</u>
<u>2.4.2 Ruolo dei miRNA nel neuroblastoma</u>	<u>23</u>
<u>2.4.3 miRNA esosomiali</u>	<u>24</u>
<u>2.5 Linea cellulare SH-SY5Y</u>	<u>25</u>
<u>3 SCOPO DELLA TESI</u>	<u>27</u>
<u>4 MATERIALI E METODI</u>	<u>28</u>
<u>4.1 Colture cellulari</u>	<u>28</u>
<u>4.1.1 Trattamento con doxiciolina</u>	<u>28</u>
<u>4.2 Isolamento degli esosomi</u>	<u>29</u>
<u>4.3 Estrazione miRNA da esosomi</u>	<u>29</u>
<u>4.4 Controllo qualitativo e quantitativo</u>	<u>30</u>
<u>4.5 Retrotrascrizione</u>	<u>31</u>
<u>4.6 Pre-Amplificazione</u>	<u>31</u>
<u>4.7 Real time PCR (Array Cards)</u>	<u>31</u>

<u>4.8</u>	<u>Analisi informatica</u>	<u>32</u>
<u>4.9</u>	<u>Trasfezione miRNA mimic</u>	<u>33</u>
<u>4.10</u>	<u>Migrazione</u>	<u>33</u>
<u>4.1.1</u>	<u>Colorazione con Falloidina</u>	<u>34</u>
<u>5</u>	<u>RISULTATI</u>	<u>35</u>
<u>5.1</u>	<u>Caratterizzazione del modello cellulare SH LIN28B+</u>	<u>35</u>
<u>5.1.1</u>	<u>Morfologia</u>	<u>35</u>
<u>5.1.2</u>	<u>Migrazione SH-SY5Y <i>LIN28B+</i></u>	<u>37</u>
<u>5.2</u>	<u>Analisi esosomi derivati da cellule SH LIN28B+</u>	<u>38</u>
<u>6</u>	<u>CONCLUSIONI</u>	<u>45</u>
<u>7</u>	<u>REFERENZE</u>	<u>48</u>

1 ABSTRACT

Il neuroblastoma è un tumore della prima infanzia ed è la neoplasia più diagnosticata nel primo anno di vita. Si tratta di un tumore maligno dello sviluppo, che nasce nei gangli neuronali del sistema nervoso simpatico periferico all'interno della midollare del surrene e/o nei gangli paraspinali addominali, ma anche, in un numero minore di casi, nei gangli simpatici del torace, del collo e della pelvi.

La stadiazione attualmente in uso è quella dell'International Neuroblastoma Risk (INRG) che, associata ad altri fattori prognostici come l'età alla diagnosi, l'istologia e l'assetto genomico, ha permesso di raggruppare tutti i pazienti in quattro categorie di rischio: molto basso, basso, intermedio e alto, al fine di definire protocolli di trattamento specifici.

Nonostante i progressi fatti nel trattamento e nella stratificazione del rischio è solo recentemente che si è iniziato ad approfondire l'interazione tra genetica del tumore e dell'ospite in quanto l'eterogeneità del neuroblastoma non consente di identificare una singola mutazione per la trasformazione tumorale.

Con l'introduzione della tecnologia si sono effettuati i primi studi di associazione a livello del genoma (GWAS), identificando le prime variazioni genetiche tra gli individui. Tra queste troviamo mutazioni somatiche e alleli polimorfici all'interno del locus LIN28B, proteina che si lega all'RNA bloccando la maturazione di let-7, una famiglia di microRNA nota per inibire la tumorigenesi.

Negli ultimi anni è cresciuto l'interesse verso gli esosomi, nanovesicole di origine endocitica rilasciate nei liquidi biologici da molti tipi cellulari, incluse le cellule tumorali, il cui contenuto riflette le caratteristiche della cellula di origine. Questa proprietà li rende una potenziale fonte di nuovi biomarcatori. Numerosi studi hanno infatti dimostrato che l'analisi del profilo dei microRNA esosomiali, piccoli RNA non codificanti che controllano l'espressione genica a livello post-trascrizionale, rappresenta un approccio non invasivo per analizzare il decorso di diverse malattie.

L'obiettivo del nostro studio è stata la caratterizzazione del profilo di espressione dei microRNA esosomiali in cellule umane di Neuroblastoma SH-SY5Y ingegnerizzate per sovraesprimere il gene LIN28B (SH-SY5Y LIN28B+), le quali rappresentano un modello di neuroblastoma ad alto rischio. A tal fine abbiamo caratterizzato il modello cellulare utilizzato, inducendo con doxicilina le cellule SH-SY5Y per sovraesprimere LIN28B. Abbiamo valutato come la sovraespressione di questo gene aumenti le capacità migratorie delle cellule, caratteristica confermata anche da riarrangiamenti del citoscheletro associati a una maggiore invasività cellulare.

Dopodiché abbiamo studiato il profilo di espressione dei miRNA esosomiali rilasciati dalle cellule SH-SY5Y LIN28B+, identificando 29 miRNA differenzialmente espressi e coinvolti in processi cellulari associati alla progressione tumorale. Tra questi sono stati selezionati sei miRNA per eseguire studi funzionali basati su esperimenti di reversione del fenotipo attraverso l'utilizzo di molecole miRNA mimic. Abbiamo definito le condizioni sperimentali ottimali di trasfezione per ottenere una significativa induzione dell'espressione del miR-501 attraverso l'utilizzo del corrispondente miRNA mimic. Abbiamo inoltre dimostrato come l'induzione del miR-501 in cellule SH-SY5Y di controllo causi un aumento delle capacità migratorie simile a quello osservato nelle SH-SY5Y che sovraesprimono LIN28B. I risultati hanno confermato l'attività pro-tumorale del miR-501 e studi futuri saranno mirati a validare la funzione degli altri 5 miRNA selezionati. Se le ricerche confermeranno l'attività pro-tumorale dei miRNA esosomiali identificati, gli stessi potranno diventare bersagli di approcci terapeutici innovativi per il trattamento del neuroblastoma ad alto rischio.

2 INTRODUZIONE

2.1 Neuroblastoma

Il neuroblastoma (NB) è un tumore della prima infanzia ed è la neoplasia più comunemente diagnosticata nel primo anno di vita con 25-50 casi per milioni di individui. Il 90% dei tumori insorge in bambini di età inferiore ai 10 anni, e presenta un'età media alla diagnosi di 18 mesi (1).

Si tratta di un tumore neuroendocrino che insorge nel sistema nervoso simpatico in via di sviluppo (quindi da qualsiasi elemento della cresta neuronale), che provoca tumori nelle ghiandole surrenali e/o nei gangli paravertebrali. Circa il 65 % di queste neoplasie si presenta nell'addome, il 5% nel collo e nelle pelvi e il 20% nel torace (2).

Il fenotipo della malattia è altamente associato all'età, alla razza e al sesso. Infatti, il decorso clinico è diverso nei neonati, che spesso hanno una regressione spontanea del tumore senza chemioterapia, rispetto ai bambini più grandi, che hanno generalmente una prognosi infausta nonostante la chemioterapia altamente invasiva, la radioterapia e l'immunoterapia; gli individui di origine africana hanno maggiori probabilità di avere un fenotipo più maligno rispetto agli individui di origine europea e, inoltre, la malattia è più comune nei maschi che nelle femmine, anche se la base genetica ed epigenetica di questa preponderanza rimane oscura.

Nessun fattore ambientale chiaramente documentato e verificato in modo indipendente ha dimostrato di influenzare il rischio di neuroblastoma. Tuttavia, le esposizioni ambientali come l'uso materno di droghe e l'uso di tinture per capelli durante la gravidanza potrebbero avere un ruolo nella malattia. Viceversa, è stato associato un effetto protettivo dell'assunzione in gravidanza di acido folico, dovuto al suo ruolo nello sviluppo neuronale (1).

I sintomi che si presentano nei bambini con neuroblastoma variano in base al numero e alla localizzazione dei tumori e possono includere sia sintomi locali che sistemici. Circa la metà dei pazienti presenta una malattia localizzata o regionale, mentre l'altra metà presenta metastasi a livello delle ossa, del midollo osseo e dei linfonodi regionali come sedi più comuni, mentre il coinvolgimento del sistema nervoso centrale e dei polmoni è raro. Un esteso coinvolgimento del fegato può essere riscontrato nei neonati e può causare malattie epatiche. Più comuni nei neonati sono anche le metastasi alla pelle che possono apparire come noduli sottocutanei indolori, in qualsiasi parte del corpo con una tonalità blu. L'infiltrazione a livello del midollo osseo, presente nell'80% dei pazienti metastatici, può causare anemia e trombocitopenia. Le lesioni ossee possono essere molto dolorose e si sviluppano prevalentemente nel cranio e nelle ossa orbitali, con

conseguenti ecchimosi periorbitali, caratteristiche del neuroblastoma, insieme a proptosi ed eventuale perdita della vista.

I neuroblastomi possono rilasciare catecolammine che causano ai pazienti vampate di calore, tachicardia o ipertensione (3,4).

Gli attuali trattamenti nel neuroblastoma sono vari a causa della natura eterogenea della malattia. L'esito del trattamento dipende da una moltitudine di fattori, tra cui l'età del paziente, l'istologia, le anomalie genetiche e lo stadio della malattia. Oltre alla consueta importanza prognostica dello stadio della malattia, molti fattori biologici aiutano a spiegare meglio il comportamento clinico del neuroblastoma, comprese le caratteristiche istologiche, le caratteristiche citogenetiche e le alterazioni (mutazioni)molecolari, in particolare l'amplificazione dell'oncogene *MYCN*.

La cattiva prognosi della malattia porta a una terapia inadeguata, a un tumore residuo non rilevato e a modalità di trattamento inefficaci. Per cui una migliore comprensione delle caratteristiche cliniche e biologiche del neuroblastoma ha permesso una più precisa stratificazione del rischio permettendo una scelta più adeguata della terapia da seguire al fine di migliorare il risultato: per i pazienti ad alto rischio attraverso l'intensificazione del trattamento e l'aggiunta di nuovi agenti, per i pazienti a basso rischio diminuendo le dosi di chemioterapia per ridurre gli effetti tardivi (4,5).

2.1.1 Stadiazione del tumore e terapia

Tabella 1. Stadiazione INSS

Stadio	Caratteristiche del tumore
1	Tumore localizzato con completa escissione grossolana, con o senza malattia microscopica residua, rappresentata da linfonodi ipsolaterali negativi microscopicamente per tumore (i linfonodi aderenti al tumore e rimossi con il tumore primitivo possono essere positivi).
2A	Tumore localizzato con escissione grossolana incompleta, con linfonodi ipsolaterali non aderenti positivi per tumore.
2B	Tumore localizzato con o senza escissione completa grossolana, con linfonodi ipsolaterali non aderenti positivi per tumore. I linfonodi controlaterali ingranditi debbono essere negativi microscopicamente.
3	Tumore unilaterale non resecabile con o senza interessamento dei linfonodi regionali o tumore localizzato unilaterale con interessamento dei linfonodi regionali contro laterali o tumore della linea mediana con estensione bilaterale dell'infiltrazione (non resecabile) o con interessamento dei linfonodi
4	Ogni tumore primario con disseminazione a linfonodi distanti, all'osso, al midollo osseo o ad altri organi (eccetto lo stadio 4S),
4S	Tumore primario localizzato in lattanti più giovani di un anno (come definiti dagli stadi 1, 2A e 2B), con disseminazione limitata a cute, fegato o midollo osseo (< 10% di cellule maligne)

L'eterogeneità clinica è una caratteristica del neuroblastoma. Nel tentativo di guidare il trattamento dei pazienti con neuroblastoma sulla base della classe di rischio, gruppi cooperativi pediatrici hanno sviluppato sistemi di classificazione basati su combinazioni di marcatori clinici e biologici prognostici (6).

Fino a poco tempo fa l'*International Neuroblastoma Staging System* (INSS) è stato utilizzato per la stadiazione dei tumori del neuroblastoma. Le linee guida dell'INSS, sviluppate nel 1986 e successivamente revisionate nel 1993, sono basate sull'entità della resezione chirurgica e sulla presenza di metastasi come è spiegato nella **Tabella 1** (3).

In questa classificazione è importante notare che, oltre ai classici stadi con cui vengono classificate a livello internazionale le neoplasie maligne, il neuroblastoma presenta anche lo stadio 4S, che include pazienti di età inferiore a 1 anno con metastasi limitate alla cute, al fegato o al midollo osseo. Una particolare caratteristica di questi ultimi pazienti è la possibilità di una spontanea regressione del tumore, anche se i meccanismi alla base di questo fenomeno non sono ancora completamente chiari siccome la maggior parte di questi tumori regredisce ancor prima dei sintomi e, quindi, di giungere al medico (1).

Questo metodo di classificazione risulta però limitato in quanto è un sistema di stadiazione post-chirurgia, così nel 2009 l'*International Neuroblastoma Risk Group* (INRG) ha pubblicato le sue raccomandazioni sia per la nuova stadiazione (**Tabella 2**), che si basa su *Imagined-defined risk factors* (IDRFs), cioè fattori di rischio definiti prima della terapia piuttosto che dopo l'intervento chirurgico. Gli IDRFs includono: l'estensione del tumore in un secondo compartimento del corpo, l'incapsulamento di qualsiasi grande vaso sanguigno, la compromissione tracheale o dei grandi bronchi, il coinvolgimento delle principali radici nervose, l'invasione del canale spinale o dei reni vicini, del mesentere, del pericardio, del fegato, del diaframma o del pancreas (4).

Questi IDRF rappresentano elementi che indicano quando il tumore è più aggressivo per il paziente o potrebbe rendere la resezione chirurgica più pericolosa e quindi meno riuscita.

Tabella 2. Stadiazione INRGS

Stadio	Caratteristiche del tumore
Stadio L	Fattori di rischio radiologici assenti: tumore localizzato che non coinvolge strutture vitali (così come definite dalla lista di IDRF) e confinato ad un compartimento corporeo
Stadio L2	Tumore regionale con uno o più IDRF
Stadio M	Malattia con metastasi a distanza (eccetto casi descritti come stadio Ms)
Stadio Ms	Malattia metastatica in bambini di età inferiore a 18 mesi, con metastasi limitata a cute, fegato e/o midollo osseo (il coinvolgimento midollare deve essere limitato a meno del 10% del totale delle cellule nucleate su striscio o biopsia)

I tumori allo stadio L1 sono tumori localizzati che non coinvolgono strutture vitali come definito dalla lista degli IDRF. Il tumore deve essere confinato all'interno di un compartimento del corpo come collo, torace, addome o bacino.

I tumori di stadio L2 sono tumori locoregionali con una o più IDRF.

Lo stadio M è definito come malattia metastatica a distanza (cioè non contigua al tumore primario), mentre lo stadio Ms è la malattia metastatica in pazienti più giovani di 18 mesi, con metastasi confinate a pelle, fegato e/o midollo osseo (7).

Lo stadio della malattia è associato ad altri fattori prognostici come l'età alla diagnosi, l'istologia e l'assetto genomico (compresi l'amplificazione dell'oncogene *MYCN*, lo stato della regione cromosomica 11q e la ploidia) per definire i gruppi a rischio di pretrattamento.

La combinazione di stadi con i vari fattori prognostici ha permesso di raggruppare tutti i pazienti in 4 categorie di rischio (molto basso, basso, intermedio e alto), permettendo così di definire protocolli di trattamento più idonei (**Tabella 3**) (6).

Tabella 3. Classificazione per fattori di rischio secondo l'INRG

Stadio INRG	Età (mesi)	Istologia	MYCN	Aberrazioni 11q	Ploidia	Gruppo di rischio
L1/L2		GN maturing/GNB intermixed				Molto basso
L1		Tutte tranne GN maturing e GNB intermixed	NA			Molto basso
			Amp			Alto
L2	<18	GN maturing/GNB intermixed	NA	No		Basso
				Si		Intermedio
	≥ 18	GNB nodulare con NB differenziante e NB differenziante	NA	No		Basso
				Si		Intermedio
		GNB nodulare scarsamente differenziato o indifferenziato/ NB indifferenziato	NA			Intermedio
		Amp		Alto		
M	<18		NA		Iperdiploide	Basso
	<12		NA		Diploide	Intermedio
	12-18		NA		Diploide	Intermedio
	<18		Amp			Alto
	≥18					Alto
Ms	<18		NA	No		Molto basso
				Si		Alto
			Amp			Alto

GN: ganglioneuroma

Amp: Amplificato

GNB: ganglioneuroblastoma

NA: non amplificato

I pazienti con Neuroblastoma a basso rischio, nel 90% dei casi presentano una prognosi favorevole con un tasso di sopravvivenza superiore a 5 anni. Generalmente a questi pazienti viene fornita una terapia minima, che spesso consiste solo nella chirurgia, ma in alcuni casi può anche avvenire una regressione spontanea del tumore.

Una chemioterapia meno aggressiva rispetto a quella dedicata a neoplasie ad alto rischio e la chirurgia sono previste per i pazienti che presentano Neuroblastoma a rischio intermedio.

I casi a rischio basso e intermedio sono meno frequenti rispetto a quelli ad alto rischio, che rappresentano il 60% e per i quali prognosi e, di conseguenza, terapia sono differenti. (8)

L'attuale trattamento standard per il Neuroblastoma ad alto rischio comprende tre fasi: induzione, consolidamento e trattamento [Tabella 4].

Tabella 4. Panoramica del trattamento del neuroblastoma ad alto rischio (Smith V & Foster J., 2018)

INDUZIONE	<ul style="list-style-type: none"> • Chemioterapia • Raccolta di cellule staminali • Resezione chirurgica del tumore primario
CONSOLIDAMENTO	<ul style="list-style-type: none"> • Chemioterapia ad alte dosi con ASCT • Radioterapia
MANTENIMENTO	<ul style="list-style-type: none"> • Immunoterapia • Acido cis-Retinoico

La chemioterapia di induzione (IC) è essenziale per ridurre il volume della massa tumorale, facilitandone la successiva asportazione chirurgica. In questa prima fase avviene anche la raccolta di cellule staminali da sangue periferico o da midollo osseo per procedere con il trapianto autologo.

Il blocco di consolidamento prevede infatti la somministrazione di chemioterapia ad alte dosi (HDC) accompagnata da trapianto autologo di cellule staminali (ASCT) e radioterapia.

La fase di mantenimento è stata sviluppata per trattare la malattia residua, che rimane nonostante i regimi di trattamento intensivi di induzione e consolidamento, e prevede l'immunoterapia con anticorpo monoclonale (mAb) anti-disialoganglioside GD2, una molecola glicolipidica di superficie

specificamente espressa da neuroblastoma, accoppiata alla somministrazione di citochine e 11-cis retinolo per stimolare il differenziamento cellulare (8,9).

Nonostante il trattamento invasivo multimodale previsto, il tasso di sopravvivenza a 5 anni dei pazienti affetti da neuroblastoma ad alto rischio non supera il 50%. La ricerca attuale si sta concentrando sull'ulteriore intensificazione della terapia per migliorare i risultati in questa popolazione di pazienti.

2.1.2 Patologia del tumore

Il neuroblastoma è un tumore maligno dello sviluppo che nasce nei gangli neuronali del sistema nervoso simpatico periferico. Queste strutture neuronali derivano dalle cellule della cresta neurale ventrolaterale, che migrano dal tubo neurale all'inizio dell'embriogenesi.

Come già detto, la maggior parte dei tumori del neuroblastoma nasce all'interno della midollare del surrene e nei gangli paraspinali addominali, ma anche, in un minor numero di casi, nei gangli simpatici del torace, del collo e della pelvi. (10)

L'ampia eterogeneità clinica e patologica di questa neoplasia riflette la biologia di sviluppo unica della cresta neurale. [Figura 1]

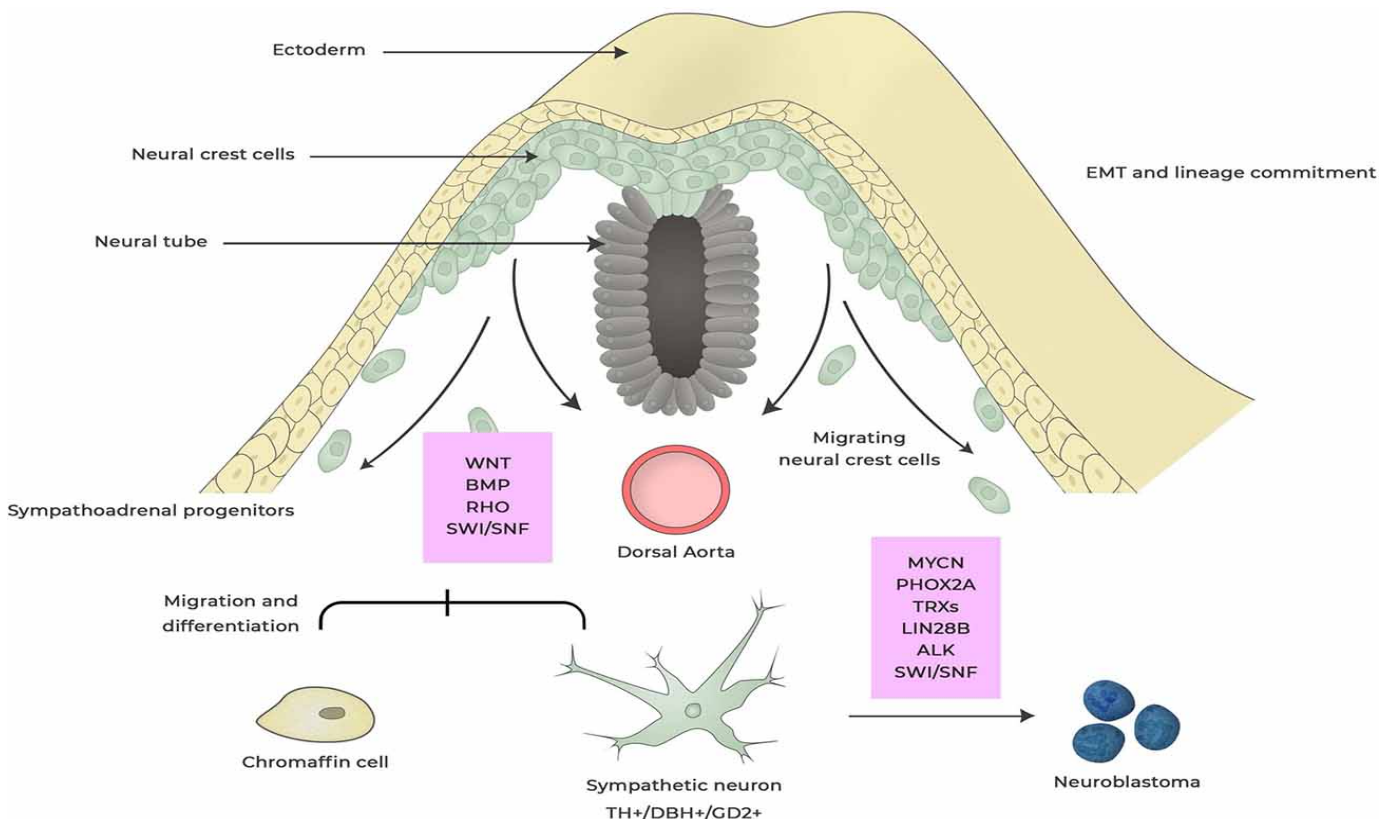


Figura 1. Sviluppo del neuroblastoma dalla cresta neurale (Johnsen JI. et al., 2019)

La cresta neurale è costituita da una popolazione di cellule embrionali che nasce durante la gastrulazione e la neurulazione e che migra in tutto l'embrione in via di sviluppo differenziandosi in diversi tessuti, tra cui gran parte dello scheletro craniofacciale, il sistema nervoso simpatico e periferico, le cellule surrenali cromaffini e i melanociti. La complessità dei tessuti derivati dalla cresta neurale suggerisce la presenza di progenitori multipotenti. Lo sviluppo, il mantenimento e la differenziazione di questa popolazione di cellule è un processo molto complesso e, di conseguenza, l'induzione, la speciazione, la delaminazione e la differenziazione della cresta neurale sono percorsi strettamente controllati e orchestrati da una rete di regolazione genetica multiforme.

Mutazioni iniziali o alterazioni durante uno qualsiasi di questi processi possono generare l'inizio della formazione del tumore (11).

Una componente centrale della maturazione della cresta neurale è una transizione programmata da epiteliale a mesenchimale (EMT) (10).

Questa transizione EMT si traduce nell'acquisizione di maggiori capacità migratorie e nella diminuzione dei requisiti per il contatto intercellulare, che permette alle cellule della cresta neurale di lasciare il tubo neurale dorsale. È importante notare che una simile transizione EMT può avere un ruolo anche nelle metastasi del neuroblastoma.

I percorsi di migrazione della cresta neurale sono determinati dal segnale del mesoderma che si sviluppa prima dell'arrivo delle cellule della cresta. In seguito all'EMT, le cellule della cresta neurale della regione del tronco possono migrare ventrolateralmente e rimanere nello sclerotomo per formare i gangli della radice dorsale o continuare a migrare in una posizione più ventrale e formare i gangli simpatici. N-myc è un oncogene che gioca un ruolo nell'aggressività del neuroblastoma e sembra essere coinvolto nella migrazione, la sopravvivenza e/o la differenziazione delle cellule che migrano verso l'aorta dorsale (12).

Si pensa, infatti, che il lignaggio simpatico-adrenale (SA) derivi da un progenitore comune che si aggrega all'aorta dorsale dopo essere migrato dalla cresta utilizzando la via ventrale. I segnali locali come le Bone Morphogenic Proteins (BMP) rilasciate dalla parete dell'aorta dorsale sono essenziali per la futura differenziazione delle cellule della cresta come cellule cromaffine, catecolaminergiche/adrenali o in neuroni simpatici, ma anche per l'espressione di PHOX2B, un fattore di trascrizione espresso in tutti i neuroni noradrenergici è critico per lo sviluppo del sistema nervoso autonomo. Questo fattore, come vedremo, sembra essere importante nello sviluppo del neuroblastoma (11).

È stato quindi ipotizzato che l'origine del neuroblastoma sia determinato dall'interruzione della maturazione dei precursori della cresta neurale, tuttavia, il sequenziamento del DNA e RNA di oltre mille pazienti non ha evidenziato una singola mutazione genetica o epigenetica responsabile dell'attivazione della tumorigenesi (13).

Allo stesso modo, i cambiamenti genomici strutturali conosciuti non sono indicati come "driver" della tumorigenesi del neuroblastoma: la delezione di 1p, l'amplificazione MYCN o il guadagno di 17q possono identificare sottotipi di neuroblastoma e avere un impatto sulla sopravvivenza, ma non esiste un'alterazione genomica comune specifica, una loss of heterozygosity (LOH) o una traslocazione genetica attribuita uniformemente a tutti i tumori ad alto rischio del neuroblastoma (10).

Di conseguenza, tumori che sono fenotipicamente e morfologicamente molto simili possono avere risposte differenti al trattamento. Per questo motivo, le ricerche sul neuroblastoma si sono concentrate sulla caratterizzazione dei trascrittomi e delle vie oncogeniche nei sottotipi tumorali più aggressivi e fatali. Oltre a chiarire le origini genetiche ed epigenetiche del neuroblastoma, questi studi sono utili per identificare nuovi approcci terapeutici per questo tumore altamente letale (14).

2.2 Genetica del Neuroblastoma

Nonostante i progressi fatti nel trattamento e nella stratificazione del rischio dei pazienti con neuroblastoma, è solo recentemente che il campo ha iniziato ad approfondire l'interazione tra genetica del tumore e dell'ospite (16). Progressi significativi sono stati fatti nella comprensione dell'ereditabilità del neuroblastoma attraverso scansioni di linkage di famiglie con la malattia e studi di associazione a livello del genoma, genome-wide association study (GWAS), di casi sporadici. Il vantaggio principale di questa tecnica rispetto ai metodi precedenti è che non sono più necessarie ipotesi sui geni candidati, ma le variazioni genetiche possono essere localizzate con precisione e non sono necessari test ai membri della famiglia (17).

2.2.1 Neuroblastoma Familiare

Nonostante la maggior parte dei tumori del neuroblastoma sorga sporadicamente, circa l'1-2% dei casi è ereditato in modo autosomico dominante con penetranza incompleta. Il neuroblastoma familiare tende a presentarsi in giovane età, con una storia familiare di parenti con lo stesso tumore e una maggiore probabilità di siti primari multipli, in particolare tumori che coinvolgono entrambe le ghiandole surrenali (16,19).

Il primo gene identificato come predisponente alla malattia è stato *PHOX2B*, individuato in famiglie affette da neuroblastoma insieme alla malattia di Hirschsprung e/o alla sindrome da ipoventilazione congenita.

Il gene *PHOX2B* regola lo sviluppo del sistema nervoso autonomo, codifica per un fattore di trascrizione che promuove l'uscita dal ciclo cellulare e differenziazione neuronale, giocando un ruolo critico nello sviluppo dei neuroni autonomi derivati dalla cresta neurale (19). È stato stimato che circa il 10% delle mutazioni germinali nel gene *PHOX2B* sono associate al neuroblastoma ereditario (20). I bambini con mutazioni frameshit o missenso del gene *PHOX2B* hanno una maggiore probabilità di sviluppare un neuroblastoma fatale, rispetto a quelli con le più comuni mutazioni di espansione della ripetizione della polialanina (PARM), il che suggerisce che queste mutazioni possono impartire un'interruzione più grave della funzione del gene. (16).

L'Anaplastic lymphoma kinase (ALK), un recettore tirosin-chinasi, è un altro gene di predisposizione al neuroblastoma. Tre mutazioni missenso germinali (R1192P, R1275Q e G1128A) sono state identificate nella maggior parte dei casi di neuroblastoma familiare. Tali mutazioni interessano il dominio tirosin-chinasico di *ALK* e ne comportano una fosforilazione costitutiva. Contemporaneamente, mutazioni in *ALK* sono state ritrovate anche nel 10-12% dei casi sporadici di neuroblastoma (16,18). Le mutazioni di *ALK* a livello germinale hanno una penetranza fenotipica incompleta, il che significa che non tutti gli individui affetti svilupperanno neuroblastoma (21). Ci sono prove che suggeriscono che una sovraespressione di *PHOX2B* può regolare positivamente l'espressione del gene *ALK*, indicando quindi una connessione tra queste due vie che sono mutate nel neuroblastoma familiare (19).

Di più recente scoperta è il gene oncosoppressore *KIF1Bβ*, in cui mutazioni germinali forniscono un vantaggio di sopravvivenza alle cellule progenitrici neuronali con potenziale maligno, permettendo loro di svilupparsi in un tumore aggressivo (22).

L'ereditabilità del neuroblastoma rimane comunque solo parzialmente compresa, in quanto circa il 15% dei casi familiari rimane irrisolto. Attraverso il sequenziamento si potrebbero avere nuove informazioni su fattori che determinano la predisposizione genetica al neuroblastoma. (18)

2.2.2 Neuroblastoma Sporadico

La maggior parte dei tumori neuroblastici insorge sporadicamente senza una storia familiare. L'introduzione della tecnologia dei polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) negli anni '90 ha permesso i primi studi di associazione a livello del genoma (GWAS), identificando così le prime variazioni genetiche tra gli individui in esame. Il primo GWAS sul cancro pediatrico è stato condotto nel 2008, identificando tre varianti sul cromosoma 6p22, che sono state associate allo sviluppo del neuroblastoma ad alto rischio. Queste varianti sono state poi mappate nei geni *CASC-15* e *NBAT-1* che codificano per lncRNA, RNA lunghi non codificanti. Studi funzionali hanno dimostrato che l'espressione sia di *CASC-15* sia di *NBAT-1* era diminuita nella malattia ad alto rischio e che la diminuzione di *CASC-15* nelle cellule di neuroblastoma aumentava le loro capacità proliferative e invasive, compromettendo la differenziazione. Al contrario, una sovraespressione di *NBAT-1* nelle cellule di neuroblastoma induceva differenziazione, indicando, quindi, che entrambi i lncRNA agiscono come soppressori tumorali nel neuroblastoma (16,18,23).

Successivamente, sono stati identificati nuovi SNP in un GWAS limitato a pazienti ad alto rischio nel cromosoma 2q35 a livello degli introni del gene *BARD1*. Questo gene forma un eterodimero con *BRCA1* ed è parte integrante del meccanismo di riparazione dei danni del DNA e quindi agisce come oncosoppressore, anche se recentemente si è dimostrato che uno splicing alternativo può portare all'espressione di isoforme oncogeniche di *BARD1* che agiscono indipendentemente da *BRCA1* (23).

Lo studio di GWAS è stato successivamente esteso a un maggior numero di pazienti, portando all'identificazione di varianti alleliche significativamente associate alla predisposizione al neuroblastoma, tra cui *LMO1* sul cromosoma 11p15.4, e *HACE1* e *LIN28B* sul cromosoma 6q16. *HACE1* codifica per un'ubiquitina ligasi E3 ed è stato identificato come un oncosoppressore, *LIN28B* è un noto oncogene che codifica per una proteina nota per la sua repressione della famiglia let-7 di microRNA. Un'alta espressione di *LIN28B* e, in concomitanza, bassi livelli di let-7 sono stati osservati in molti tumori umani, tra cui il neuroblastoma (18,24,25).

2.2.3 Alterazioni genetiche e genomiche

L'eterogeneità alla base dei tumori neuroblastici non consente di individuare una singola mutazione "driver" responsabile della trasformazione tumorale. Tuttavia, diverse alterazioni genetiche sono state osservate nel neuroblastoma, tra cui amplificazioni geniche, polimorfismi e alterazioni cromosomiche.

ALK

L'anaplastic Lymphoma Kinase (*ALK*) è una tirosin-chinasi recettoriale e un membro della superfamiglia dei recettori dell'insulina. L'alta espressione di questo recettore è stata frequentemente osservata nei tumori neuroectodermici pediatrici e nel neuroblastoma.

Come precedentemente discusso, tre mutazioni puntiformi missenso a base singola (R1192P, R1275Q e G1128A) si raggruppano in regioni regolatrici chiave del dominio della chinasi causando un'attivazione costitutiva del recettore. R1275Q rappresenta la mutazione più comune e si riscontra nel 45% dei casi familiari e in un terzo nei casi sporadici (26). Un recente studio su 1596 campioni di neuroblastoma ha rivelato che le mutazioni di *ALK* sono associate a una sopravvivenza più bassa dei pazienti con malattia a intermedio e alto rischio (27).

Un meccanismo meno comune di attivazione di *ALK* nel neuroblastoma, riscontrato nel 2-3% dei casi, coinvolge l'amplificazione del gene, che porta a una maggior espressione proteica e un'attività chinasi costitutiva. Altri meccanismi non frequenti di attivazione di *ALK*, indipendenti dal ligando, includono traslocazioni e grandi delezioni con conseguente troncamento della regione extracellulare e, quindi, attivazione costitutiva dell'attività chinasi. Infine, recenti analisi di sequenziamento del genoma di neuroblastoma primari e in abbinamento alle rispettive recidive hanno mostrato una maggiore frequenza di mutazioni *ALK* alla recidiva, indicando l'importanza di questo oncogene sia nel neuroblastoma primario che recidivo (26).

MYCN

L'oncogene *MYCN* gioca un ruolo importante nella tumorigenesi del neuroblastoma e definisce un sottogruppo aggressivo di tumori. L'amplificazione di *MYCN* (definita come più di 10 copie) si trova in circa il 20% dei casi e conferisce una prognosi particolarmente sfavorevole.

Questo fattore di trascrizione attiva e reprime i bersagli genetici (ad esempio mRNA, miRNA, lncRNA) attraverso il legame diretto al DNA e meccanismi indiretti di interazione proteina/proteina. Sia *MYCN* che *c-MYC* svolgono funzioni anti-p53, pro-proliferative e pro-EMT, determinando il blocco della cascata apoptotica e una proliferazione cellulare incontrollata che favorisce lo sviluppo del neuroblastoma (10).

In particolare, l'azione pro-tumorale di *MYCN* agisce su più livelli, tra cui:

- Metastasi: *MYCN* agisce su vari aspetti della metastatizzazione come adesione, mobilità, invasione e degradazione delle matrici circostanti. In particolare, la regolazione negativa

delle integrine $\alpha 1$ e $\beta 2$, mediata da *MYCN*, promuove il distacco delle cellule dalla matrice extracellulare e quindi la migrazione e l'invasione.

- Sorveglianza immunitaria: *MYCN* modula gli antigeni espressi sulle cellule tumorali. Uno degli antigeni repressi è MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) richiesto per la chemioattrazione delle cellule T natural killer (NKT). Queste cellule possono inizialmente secernere una serie di citochine pro-infiammatorie per reclutare cellule immunitarie, stimolare la maturazione di cellule dendritiche e generare cellule T specifiche per l'antigene per colpire il tumore.
- Angiogenesi: *MYCN* facilita la secrezione di fattori che promuovono la crescita delle cellule endoteliali e previene il rilascio di inibitori dell'angiogenesi, promuovendo la vascolarizzazione del tumore.
- Autorinnovamento e pluripotenza: *MYCN* svolge un ruolo critico nel mantenimento di uno stato simile a quello staminale, bloccando le vie di differenziazione e attivando i geni di auto-rinnovamento e pluripotenza. Un ulteriore prova alla promozione dell'autorinnovamento da parte di *MYCN* è dato dalla scoperta che le linee cellulari di neuroblastoma amplificate con *MYCN* tendono a subire una divisione cellulare simmetrica, mentre le linee non amplificate si dividono preferibilmente in modo asimmetrico (28).
- Tutte queste considerazioni rendono *MYCN* uno dei principali driver oncogenici del neuroblastoma, e la sua amplificazione è sempre associata a una malattia ad alto rischio. Infine, da recenti studi è stato confermato che, a causa della vicina localizzazione sul cromosoma 2p, i geni *ALK* e *MYCN* possono essere co-amplificati e cooperare per promuovere la tumorigenesi (10).

ATRX

Il gene *ATRX* codifica per una elicasi ATP-rimodellante ed è un altro membro della famiglia SWI/SNF di modificatori della cromatina. Funzionalmente è coinvolto nella regolazione della lunghezza dei telomeri. Si pensa che *ATRX* funzioni anche epigeneticamente attraverso il reclutamento dell'istone 3.3 nelle regioni telomeriche per mantenere la stabilità cromosomica (29). Le mutazioni sono state trovate nel 44% dei casi di neuroblastoma in stadio 4 che si presentano in bambini di età con più di 12 anni e solo nel 9% dei casi in bambini con meno di dodici anni. In particolare, nessuna mutazione è stata identificata in bambini di età inferiore a un anno (10).

ALTERAZIONI CROMOSOMICHE SEGMENTALI

Alcuni neuroblastomi ad alto rischio non mostrano mutazioni somatiche ricorrenti in nessun gene codificante le proteine note. Tuttavia, in questi tumori, si osserva maggiormente la presenza di mutazioni somatiche ricorrenti in regioni non codificanti del genoma, come elementi enhancer o altre regioni di regolazione, ma soprattutto alterazioni ricorrenti nel numero di copie cromosomiche segmentali dette anche duplicazioni segmentali (LCR), che consistono in blocchi di poche sequenze di DNA ripetute che possono causare delezioni, duplicazioni, ma anche inversioni o traslocazioni (13).

Sono state identificate diverse alterazioni cromosomiche con un forte impatto prognostico e includono la perdita dei cromosomi 1p, 3p, 4p, 6q e 11q, che si pensa esprimano geni soppressori del tumore, e guadagni dei cromosomi 1q, 2p e 17q, su cui mappano presunti oncogeni.

Il guadagno di 17q è stato riportato in più del 50% dei casi di neuroblastoma e la perdita di 1p è stata identificata in un terzo dei casi. Sia l'acquisizione di 17q sia la perdita di 1p sono correlate con l'amplificazione di MYCN e a una cattiva prognosi (30).

Insieme alle amplificazioni degli oncogeni, queste alterazioni genomiche possono portare alla deregolazione degli RNA messaggeri, dei microRNA e di altri RNA non codificanti che interferiscono con l'apoptosi, il differenziamento e la sorveglianza immunitaria. (19)

POLIMORFISMI LIN28B

Gli alleli polimorfici all'interno del locus *LIN28B* sono significativamente associati allo sviluppo del neuroblastoma. LIN28B è una proteina che si lega all'RNA che blocca la maturazione di let-7, una famiglia di microRNA nota per inibire la tumorigenesi. *LIN28B* si lega anche direttamente agli mRNA di geni bersaglio, influenzandone probabilmente la trascrizione e la traduzione (31).

LIN28B regola l'espressione di let-7 legandosi all'anello terminale del pre-miRNA e impedendo quindi la scissione e la maturazione del miRNA mediata da Drosha.

La sovraespressione di *LIN28B* a livello della cresta neurale può portare al mantenimento di un fenotipo indifferenziato. È stato dimostrato, infatti, che la regolazione dell'espressione di let-7 influenza la proliferazione delle cellule della cresta neurale durante lo sviluppo embrionale, contribuendo al mantenimento della staminalità (15). L'analisi delle linee cellulari hanno mostrato che *LIN28B*, oltre a reprimere l'espressione del miRNA let-7, determina un forte aumento della quantità di proteina MYCN.

La sovraespressione di *LIN28B* è causata da un'amplificazione genica solo in alcuni casi poiché la grande maggioranza dei tumori neuroblastici riporta una sovraespressione in assenza di aberrazioni genetiche. Il sequenziamento dell'intero genoma di tumori di neuroblastoma non ha mostrato potenziali mutazioni attivanti o aberrazioni strutturali nella sequenza codificante di *LIN28B* o nelle sue regioni promotrici. L'aumento dell'espressione potrebbe quindi derivare da cambiamenti epigenetici come la metilazione alterata o la modificazione degli istoni (33).

È stata ulteriormente osservata una significativa correlazione inversa tra miR-125b e *LIN28B*: questo miRNA è responsabile dell'inibizione di *LIN28B*. Il miR-125 mappa in una regione cromosomica frequentemente interessata da delezione nel neuroblastoma. Ciò previene l'inibizione dell'espressione di *LIN28B*. Gli stessi miRNA let-7, sono noti per colpire *LIN28B*, creando così un ciclo feed-forward in cui *LIN28B* aumenta l'espressione della propria proteina attraverso l'inibizione dei miRNA let-7. Inoltre, *MYCN* stimola la trascrizione di *LIN28B*, accentuando ulteriormente l'espressione di questa proteina (32).

La delucidazione dell'azione dell'intero asse *LIN28B*-let-7-*MYCN* e il suo ruolo nel sostenere la proliferazione, la vitalità cellulare e la soppressione della differenziazione dei neuroblasti potrebbe offrire nuove opportunità di intervento farmacologico e nuovi approcci terapeutici per il neuroblastoma.

2.3 Vescicole extracellulari

La necessità di nuovi strumenti diagnostici molecolari nell'oncologia e, in particolare, nel neuroblastoma, ha recentemente portato a un interesse sempre maggiore per le biopsie liquide come fonte di biomarcatori.

Nei fluidi corporei si possono trovare vescicole extracellulari, strutture delimitate da membrane, utilizzate nella comunicazione intercellulare, che sono capaci di trasferire miRNA, mRNA, proteine e lipidi, influenzando così processi fisiologici e patologici.

Le vescicole extracellulari sono state caratterizzate in base alla dimensione e alla loro origine in tre diverse classi:

- Corpi apoptotici (1000-5000 nm): derivano da cellule che sono andate incontro a morte cellulare programmata.
- Microvescicole (100-1000 nm): prodotte per gemmazione esterna della membrana plasmatica.

- Esosomi (30-100 nm): sono le vescicole più piccole e originano dalla gemmazione interna della membrana endosomiale e dalla sua fusione con la membrana plasmatica (35).

2.3.1 Esosomi

Gli esosomi sono le vescicole che hanno ricevuto una crescente attenzione negli ultimi anni. Sono stati infatti descritti in diversi stati patologici, in quanto il loro contenuto può includere preziosi biomarcatori (36).

Gli esosomi sono rilasciati nello spazio extracellulare dalla maggior parte dei tipi di cellule, tra cui piastrine, linfociti B e T, cellule epiteliali, cellule muscolari lisce, cellule staminali mesenchimali, sia in condizioni normali che patologiche e sono stati trovati in molti fluidi corporei, tra cui plasma, urina, saliva, latte materno, liquido sinoviale e cerebrospinale (37).

La biogenesi degli esosomi ha inizio nel sistema endosomiale. Gli endosomi si formano per invaginazione della membrana plasmatica attraverso un processo clatrina-dipendente o indipendente. All'interno della via endocitica, sono suddivisi in: endosomi precoci, endosomi tardivi ed endosomi di riciclo. Gli endosomi precoci hanno forma tubolare, sono localizzati solitamente nella porzione esterna del citoplasma e maturano in endosomi tardivi, di forma sferica e più vicini al nucleo. In questo processo di maturazione, la membrana endosomiale si invagina per formare vescicole intraluminali (ILV) nel lume degli organelli. L'ultimo stadio in cui sono presenti le ILV corrisponde ai "multivesicular bodies" (MVB) (38).

Il destino delle MBV è essere duplice. Una possibilità è che si fondano con i lisosomi, portando alla degradazione e al riciclaggio del loro contenuto proteico, nucleotidico e lipidico. Poiché gli esosomi trasportano fattori di crescita e altre molecole di segnalazione, la fusione dei MVB con i lisosomi dovrebbe spegnere la segnalazione autocrina. L'altra via è la fusione con la membrana plasmatica, che comporta il rilascio delle ILV nell'ambiente extracellulare sotto forma di esosomi promuovendo così la segnalazione (39).

Esistono tre meccanismi attraverso cui gli esosomi vengono internalizzati nelle cellule bersaglio: 1) endocitosi mediata da recettori, 2) fusione diretta con la membrana plasmatica delle cellule riceventi, 3) processi attivi di fagocitosi o macropinocitosi. Gli esosomi internalizzati rilasciano quindi il loro contenuto nel citoplasma delle cellule bersaglio, attivando specifiche risposte cellulari (36,40).

Come descritto sopra, un'ampia varietà di molecole è contenuta negli esosomi, tra cui proteine, lipidi, DNA, mRNA e miRNA. In particolare, il fatto che i miRNA siano caricati all'interno degli

esosomi tramite meccanismi attivi di selezione che variano in base allo stato della cellula di origine avvalorando l'importanza di queste molecole come biomarcatori (40).

2.4 miRNA

I miRNA sono brevi sequenze (21-25 nucleotidi) di molecole di RNA a singolo filamento non codificanti, che svolgono un ruolo chiave nella regolazione post-trascrizionale dell'espressione genica, influenzando diversi eventi biologici come la proliferazione cellulare, la differenziazione e l'apoptosi (41). La funzione regolatoria dei miRNA si esplica tramite il loro legame alla regione non tradotta 3' dell'RNA messaggero bersaglio per indurre la sua degradazione e inibire la traduzione.

2.4.1 Biogenesi

Si stima che circa il 50% delle sequenze che codificano i miRNA sia localizzata in regioni del DNA non codificanti proteine, mentre il restante 50% si troverebbe per lo più negli introni dei geni codificanti e viene generalmente cotrascritta con geni ospiti e processata separatamente (42).

I miRNA sono inizialmente trascritti dalla RNA polimerasi II come lunghi miRNA primari (pri-miRNA). Il pri-miRNA viene poi trasformato in un RNA precursore (pre-miRNA) di 70-120 nucleotidi da un complesso multiproteico. Questo complesso contiene un enzima RNasi III nucleare chiamato Drosha che dimerizza con DGCR8, una proteina che lega l'RNA a doppio filamento. Il pre-miRNA appena trascritto viene poi esportato nel citoplasma dall'esportina-5 e trasformato da Dicer-1 in duplex maturo lungo circa 18-23 nucleotidi. Successivamente la proteina TRBP facilita l'ingresso del miRNA maturo associato a Dicer-1 all'interno del complesso RISC, che contiene la proteina catalitica Argonata-2 (Ago-2). I due filamenti di RNA inseriti in RISC vengono quindi separati in virtù dell'azione micro-ribonucleare del complesso RISC **[Figura 2]**.

L'azione del miRNA maturo sull'mRNA bersaglio dipende dal grado di complementarità tra i due: se quest'ultima sarà elevata si avrà degradazione del messaggero, altrimenti una minor affinità determinerà il blocco della traduzione (42). In entrambi i casi il risultato sarà l'assenza del prodotto proteico finale.

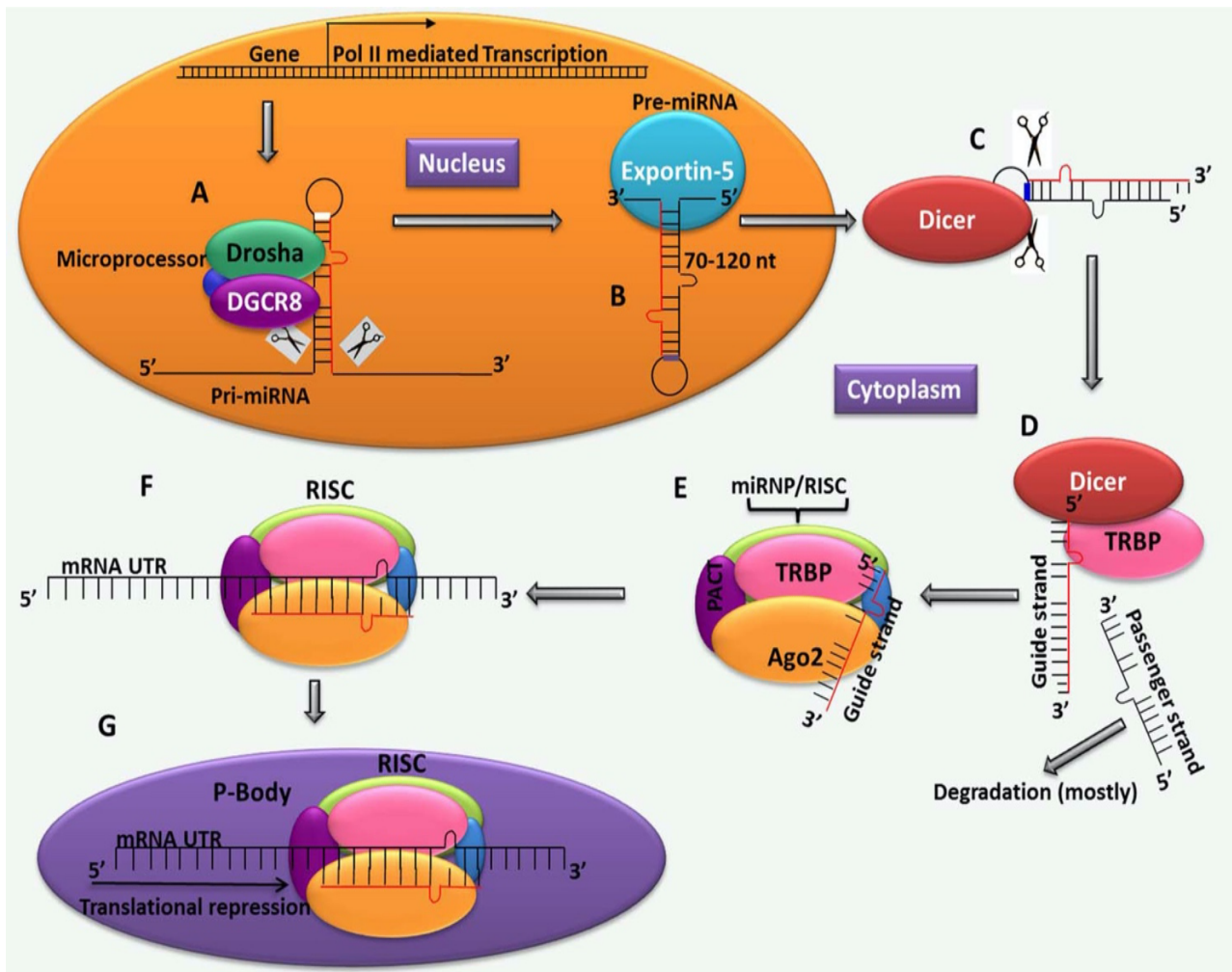


Figura 2. Biogenesi dei miRNA (Bhaskaran M. et al., 2014)

2.4.2 Ruolo dei miRNA nel neuroblastoma

Considerando l'importanza dei miRNA nella maggior parte dei processi cellulari, alterazioni nella loro funzione sono state associate a tumorigenesi e metastasi. I profili di espressione dei miRNA sono stati correlati alla prognosi, alla differenziazione e all'apoptosi nei tumori NB. La deregolazione dei miRNA nel neuroblastoma maligno potrebbe essere dovuta all'attività di *MYCN* amplificato a delezioni cromosomiche o a una regolazione epigenetica anomala. Dati recenti hanno mostrato che sette miRNA, tra cui il cluster mir-17 e mir-92 sono indotti da *N-myc in vitro*, e la loro alta espressione è correlata all'amplificazione di *MYCN* nei tumori, confermando il loro effetto oncogenico nel neuroblastoma.

Il miR-34a svolge un ruolo di oncosoppressore nel neuroblastoma in quanto è un bersaglio diretto di p53 (12).

Nell'asse regolatorio p53 induce l'espressione di miR-34 il quale, a sua volta, attiva p53 inibendo SIRT1, portando al risultato finale di attivazione dell'apoptosi (43).

I miRNA sono coinvolti anche nella metastatizzazione tumorale. Sono stati confrontati i profili di espressione dei miRNA tra tumori primari e tumori metastatici del NB e sono stati osservati cambiamenti significativi di 54 miRNA nei campioni metastatici, di cui 35 miRNA upregolati e 19 miRNA downregolati. Tra i miRNA upregolati nei tumori metastatici sono inclusi i miR-10b, miR-29a/b e miR-335, noti per promuovere l'invasione cellulare. Al contrario miR-338-3p, e la famiglia let-7 sono i miRNA maggiormente downregolati nei tumori metastatici (12).

Poiché il neuroblastoma ha un profilo di espressione dei miRNA caratteristico e queste molecole possono essere dei biomarcatori per la diagnosi, la risposta alla terapia e la prognosi, ristabilire i livelli di miRNA alterati potrebbe essere una valida strategia terapeutica (44).

2.4.3 miRNA esosomiali

La biopsia dei tessuti rappresenta ancora il gold standard per la diagnosi dei tumori. Tuttavia, sono necessari approcci meno invasivi per individuare e monitorare i tumori in ambito pediatrico. Le biopsie liquide rappresentano una fonte di biomarcatori per il monitoraggio del paziente e la decisione terapeutica. Le cellule tumorali rilasciano costitutivamente esosomi, che riflettono le caratteristiche della cellula da cui originano e svolgono un ruolo importante nella comunicazione cellula-cellula. È ormai noto che il numero di esosomi rilasciati dalle cellule neoplastiche è maggiore rispetto alle cellule normali e che cambiamenti qualitativi e quantitativi del loro carico si possono osservare durante la progressione tumorale, riflettendo l'evoluzione del tumore. L'evidenza che le cellule tumorali comunicano attraverso la secrezione di miRNA nei fluidi corporei e che questi miRNA possono essere trasportati dagli esosomi e trasferiti a cellule bersaglio ha aperto interessanti scenari sulla possibilità di usare queste vescicole come fonte di nuovi biomarcatori. I miRNA contenuti negli esosomi (exo-miRNA) sono particolarmente stabili nei fluidi biologici poiché sono protetti da un doppio strato lipidico ed è stato dimostrato che pazienti oncologici e individui sani hanno profili di exo-miRNA differenti (45).

È stato fatto uno studio sugli esosomi derivati dal sangue periferico di pazienti con neuroblastoma ad alto rischio, confrontando il profilo di espressione degli exo-miRNA alla diagnosi e dopo la chemioterapia di induzione per determinare se l'espressione differenziale degli exo-miRNA possa essere indicativa della risposta al trattamento (46). Lo studio ha dimostrato la presenza di esosomi derivati specificamente dalle cellule di neuroblastoma nel plasma dei pazienti in esame. È stata osservata una riduzione degli esosomi derivati dal tumore dopo la chemioterapia, indice dell'effetto inibitorio del trattamento sul numero di vescicole rilasciate dal tumore.

Sono stati identificati inoltre, tre exo-miRNA differenzialmente espressi (miR-342-3p, -29c, let-7b) in grado di discriminare significativamente i pazienti very good partial response (VGPR, che hanno mostrato una buona risposta) e minor response (MR, che hanno mostrato una scarsa risposta). In particolare, i pazienti MR hanno mostrato una notevole riduzione di miR-342-3p, miR-29c, e let-7b dopo il trattamento, mentre nei soggetti VGPR la loro espressione è rimasta principalmente invariata. I tre exo-miR sono coinvolti nella soppressione del tumore e nella chemioresistenza quindi la loro diminuita espressione può rappresentare un importante meccanismo responsabile della scarsa risposta dei pazienti High- risk Neuroblastoma (HR-NB) alla chemioterapia di induzione (46).

La possibilità di isolare gli esosomi da diversi fluidi biologici, come il sangue e le urine, e di monitorare l'espressione dei miRNA in modo non invasivo per il paziente, consente di tenere sotto controllo l'evoluzione del tumore e la risposta alla terapia, permettendo lo sviluppo di trattamenti sempre più mirati nel neuroblastoma (45).

2.5 Linea cellulare SH-SY5Y

Le cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y sono state ricavate nel 1970 dal tessuto di un neuroblastoma metastatico di una bambina di quattro anni. Le cellule della linea SH-SY5Y sono una popolazione cellulare dalla morfologia simil-neuroblastica, con un corpo cellulare a forma di goccia e piccoli neuriti, che crescono per buona parte come monostrato formando piccoli aggregati o clusters, mentre una parte minore si trova in sospensione e rappresenta le cellule in mitosi (47). Queste cellule costituiscono un modello ben caratterizzato per lo studio *in vitro* della differenziazione in un fenotipo simil-neuronale inducibile da vari agenti differenzianti esogeni, come l'acido retinoico, gli esteri del forbolo, il fattore di crescita dei nervi (NGF), e l'analogo membrana-permeabile del cAMP, il dibutiril-cAMP. Esprimono i canali per il calcio, sia di tipo N sia di tipo L, i recettori muscarinici (M₃) e nicotinici, i recettori per il neuropeptide Y e hanno la capacità di convertire il glutammato in acido gamma-aminobutirrico (GABA), la colina in acetilcolina e mostrano attività dopamina- β - idrossilasica (47).

La linea SH-SY5Y, inoltre, è molto usata come modello per lo studio della morte cellulare neuronale in diverse malattie neurodegenerative croniche indotte da stress ossidativo come il morbo di Parkinson, di Alzheimer e di Huntington, oltre che come modello per lo studio della neurotrasmissione simpatica e della neurotrasmissione dopaminergica nel Parkinson (48).

3 SCOPO DELLA TESI

L'obiettivo dello studio è stato la caratterizzazione del profilo di espressione dei microRNA esosomiali in cellule umane di Neuroblastoma SH-SY5Y che sovraesprimono il gene *LIN28B* (SH-SY5Y *LIN28B+*) e rappresentano un modello di neuroblastoma ad alto rischio.

I miRNA contenuti negli esosomi (exo-miRNA) possono essere associati allo sviluppo e alla progressione del tumore, diventando quindi potenziali bersagli di nuovi approcci terapeutici.

Allo scopo di identificare tali molecole, abbiamo caratterizzato il profilo di espressione di exo-miRNA della linea cellulare di neuroblastoma SH-SY5Y *LIN28B+* e il loro ruolo è stato analizzato con studi funzionali in vitro, attraverso la trasfezione delle cellule con miRNA mimics.

I miRNA mimic sono miRNA sintetizzati chimicamente che imitano i miRNA presenti in natura. Introdurre miRNA mimic nelle cellule comporta una maggiore produzione di complessi RISC contenenti il filamento guida del miRNA che andrà ad inibire i geni bersaglio, consentendo quindi di valutare i cambiamenti fenotipici derivati dall'attività del miRNA in esame.

Gli studi funzionali mirano ad analizzare il coinvolgimento degli exo-miRNA maggiormente modulati in processi come la migrazione cellulare, dimostrando la loro attività pro-tumorale.

4 MATERIALI E METODI

4.1 Colture cellulari

Le cellule SH-SY5Y sono una linea di cellule neuroepiteliali di neuroblastoma umano, derivata da subclonazioni di cellule SK-N-SH, una linea cellulare ottenuta da tumore osseo metastatico.

Le cellule SH-SY5Y vengono mantenute in fiasche aventi superficie uguale a 75cm² e tappo con filtro sterilizzante, nelle quali sono seminate ad una densità di $1,5 \times 10^6$ in 10 ml di terreno di coltura costituito dal mezzo *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI-1640) contenente il 10% di siero fetale bovino (FBS), l'1% del mix di antibiotici streptomicina-penicillina e 1% di L-glutamina che ne promuove la crescita. Le cellule sono mantenute alla temperatura di 37°C in un'atmosfera composta per il 5% da CO₂ e il 95% da aria.

Il passaggio delle cellule viene effettuato settimanalmente al raggiungimento di una confluenza dell'80%: le cellule vengono lavate una o due volte con 3 ml di una soluzione salina *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (D-PBS) sterile e staccate dalla fiasca con 1 ml di una soluzione contenente tripsina 0,05 ed EDTA 0,02%. Dopo 10 minuti in incubatore a 37°C, la tripsina viene inattivata per aggiunta di 9 ml di terreno completo RPMI-1640 al 10% FBS. Dopo accurata risospensione delle cellule contenute nelle fiasche, si procede trasferendo le stesse in una provetta da 15 ml e centrifugando a 1200 rpm per 5 minuti a 4°C.

4.1.1 Trattamento doxiciclina

Cellule SH-SY5Y ingegnerizzate per la sovraespressione del gene *LIN28B* vengono piastrate in una fiasca da 75 cm² in 10 ml di terreno di coltura costituito da RPMI-1640 contenente il 10 % di siero fetale bovino (FBS), 2 mM penicillina/streptomicina e 2 mM di glutamina. Il siero FBS contiene esosomi, quindi viene opportunamente ultracentrifugato prima di preparare il terreno, in modo da eliminare le vescicole che altrimenti verrebbero isolate insieme alla frazione di esosomi rilasciata nel surnatante cellulare. Quando le cellule sono ben adese viene aggiunta doxiciclina da uno stock 1mg/ml diluita in rapporto 1:1000 nel terreno di coltura per attivare il sistema inducibile *LIN28B*. Dopo una settimana di trattamento con doxiciclina (somministrata ogni 48 ore) viene raccolto surnatante per l'isolamento degli esosomi e parallelamente vengono raccolte le cellule per verificare la sovraespressione di *LIN28B*. Come controllo vengono utilizzate le cellule SH-SY5Y non indotte con doxiciclina. Le cellule indotte con doxiciclina verranno indicate con la sigla SH-SY5Y *LIN28B+* e le cellule di controllo non indotte verranno indicate con la sigla SH-SY5Y CTR.

4.2 Isolamento degli esosomi

Gli esosomi sono stati isolati dal terreno di coltura cellulare utilizzando l'exoRNeasy Serum/ Plasma Maxi kit (Qiagen Italia, Milano, Italy), che sfrutta membrane di affinità per legare efficacemente gli esosomi intatti. Il protocollo prevede una prima fase di isolamento degli esosomi seguita da una fase di purificazione dell'RNA, in seguito alla lisi delle vescicole.

Nella prima parte, il terreno di coltura è stato centrifugato a 500 x g per 20 minuti a temperatura ambiente. Il surnatante recuperato viene quindi filtrato su un filtro da 0.22 µm e quindi centrifugato per 10 minuti a 500 x g. Successivamente, al surnatante recuperato è stato aggiunto un ugual volume di buffer XBP, che è in grado di legare gli esosomi su un filtro della colonna exoEasy spin column. L'intero volume è stato raccolto in una colonna exoEasy spin e centrifugato un minuto a 500 x g. Una volta che è stato eliminato lo scarto, viene effettuato un lavaggio con 10 ml di buffer XWP seguito da una centrifuga di 5 minuti a 5000 x g. Dopo che lo scarto è stato eliminato, gli esosomi rimasti sul filtro della colonnina vengono lisati con 700 µl di Qiazol. Il filtro è stato trasferito in una nuova eppendorf e gli esosomi lisati sono stati aggiunti alla membrana. Gli esosomi sono stati eluiti con una centrifuga di 5000 x g per 5 minuti. Si procede quindi con la seconda parte del protocollo, che prevede la purificazione dell'RNA esosomiale.

4.3 Estrazione miRNA da esosomi

Per estrarre l'RNA totale dagli esosomi sono stati aggiunti 90 µl di cloroformio al lisato ottenuto come descritto nel paragrafo precedente. Il campione è stato quindi incubato a temperatura ambiente per 2-3 minuti e successivamente centrifugato a 12000 x g per 15 minuti a 4°C centrifugato a 12000 x g per 15 minuti a 4°C per consentire la separazione della fase acquosa contenente gli acidi nucleici dall'interfase proteica e dalla fase organica sottostanti. A tale fase acquosa, raccolta e trasferita in una nuova eppendorf, vengono aggiunti due volumi di etanolo 100%. I campioni vengono trasferiti in colonne RNeasy MinElute e centrifugati a 8000 x g per 15 secondi a T ambiente. Le colonnine RNeasy MinElute contengono un volume massimo di 700 µl quindi, questo passaggio è stato ripetuto fino a esaurimento del campione. È stato quindi effettuato un lavaggio con 700 µl di buffer RWT, seguito da 2 lavaggi con 500 µl di buffer RPE (QIAGEN). Per asciugare bene il filtro, viene fatta una centrifuga a secco a 8000 x g per 5 minuti. Viene quindi posto il filtro in una nuova eppendorf ed eluito l'RNA con 19 µl di acqua RNasi-free. Si lascia agire l'acqua per un minuto sulla membrana, quindi si centrifuga a massima velocità per 1 minuto. In questo modo viene eluito l'RNA totale contenuto negli esosomi.

4.4 Controllo qualitativo e quantitativo

Il controllo di qualità dell'RNA è stato effettuato tramite elettroforesi capillare con lo strumento Agilent 2100 Bioanalyzer, usando lo small RNA Assay (Agilent Technologies Spa, Milano, Italy). Il sistema Agilent 2100 rappresenta lo standard per la valutazione e la quantificazione della quantità dell'RNA. L'elettroforesi capillare avviene su chip microfabbricati, dopo la corsa elettroforetica gli RNA vengono separati e successivamente rilevati attraverso la fluorescenza indotta da laser. Il software genera un elettroferogramma che mostra i risultati quali la concentrazione del campione e la qualità dell'RNA analizzato. Lo small RNA chip impiegato in questa analisi è stato disegnato per valutare la popolazione di small RNAs nei campioni in esame e, in particolare, per fornire la percentuale di miRNA presenti nella frazione inclusa nella regione corrispondente alla lunghezza di 20-40 nucleotidi.

La valutazione quantitativa invece, è stata effettuata utilizzando il QIAexpert (QIAGEN), uno spettrofotometro microfluidico UV/VIS che sfrutta la capacità degli acidi nucleici di assorbire la luce UV con un massimo di assorbimento d'onda di 260 nm. Lo spettro di assorbimento varia da 230 nm a 280 nm. Il QIAexpert utilizza vetrini microfluidici usa e getta per analizzare fino a 16 campioni inserendo solo 2 µl di campione nei capillari del QIAexpert slide. Dopo aver inserito la slide QIAexpert nello strumento la lettura viene completata in due minuti.

Oltre alla quantificazione dell'RNA (in ng/µl) determinata dallo spettro di assorbimento a lunghezze d'onda 260 e 280 nm, attraverso QIAexpert si riesce a determinare la purezza dell'acido nucleico utilizzando i rapporti A260/A280, che rappresenta l'indice di contaminazione delle proteine (valore ottimale 1.8-2.0), e A260/A230, che rappresenta l'indice di contaminazione da fenoli (valore ottimale circa 2.2)

4.5 Retrotrascrizione

I campioni di RNA estratti sono stati retrotrascritti in cDNA utilizzando il TaqMan® microRNA Reverse Transcription Kit, che consente di retrotrascrivere in modo specifico i microRNA. È stata retrotrascritta una quantità di campione pari a 55 ng in un massimo di 3 µl. La mix di retrotrascrizione di 4.5 µl totali è costituita da 0,80 µl di Megaplex RT Human Pool A primer (Thermo Fisher Scientific) (10X), 0,20 µl di dNTPs con dTTP, 1.50 µl di multiscribe reverse transcriptase, 0.80 µl di RT buffer (10X), 0,90 µl di MgCl₂, 0.10 µl di RNase inhibitor, 0.20 µl di H₂O.

I campioni dopo essere stati vortexati e centrifugati, sono stati retrotrascritti con il seguente programma: 2 min a 16° C, 1 min a 42° C e 1 sec a 50° C per 40 cicli. Dopo 5 minuti a 85° C la temperatura è stata mantenuta a 4° fino all'estrazione del campione dalla macchina.

4.6 Pre-Amplificazione

La retrotrascrizione di una piccola quantità di RNA prevede una fase di pre-amplificazione prima di procedere con la Real-Time PCR. Per la pre-amplificazione è stata preparata una soluzione con 12.5 µl di TaqMan® pre-amp master mix, 2.5 µl di Megaplex pre-amp primers Human Pool A e 7.5 µl di H₂O, con un volume totale di 22.5 µl per campione. Sono stati aggiunti 2.5 µl di cDNA, per arrivare ad un volume finale di 25 µl. La pre-amplificazione è stata eseguita con il seguente programma:

- un ciclo di 10 min a 95° C, 2 min a 55° C, 2 min a 72° C.
- 15 sec a 95° C e 4 min a 60° C per 12 cicli.
- un ciclo di 10 min a 99.9° C,

La temperatura è quindi stata abbassata a 4° fino all'estrazione del campione dalla macchina. Prima di essere congelati a -20° C, sono stati aggiunti 75 µl di acqua ai campioni.

4.7 Real time PCR (Array Cards)

I campioni di RNA pre-amplificati sono stati usati per effettuare l'analisi del profilo di espressione di miRNA attraverso le TaqMan-Array Human MicroRNA A (Thermo Fisher Scientific) Cards, che consentono di misurare l'espressione di 381 targets. Le cards vengono corse sul ViiA7 Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific).

La mix di reazione è stata preparata utilizzando 450 µl di TaqMan® Universal Master Mix no UNG, 9 µl di campione pre-amplificato e 441 µl di H₂O. Il campione viene aliquotato in frazioni di 100 µl in ognuno degli 8 pozzetti disponibili sulla card. Viene quindi avviato il programma di amplificazione su ViiA7 Real Time PCR System.

4.8 Analisi informatica

L'elaborazione dei dati, la categorizzazione, la normalizzazione, il filtraggio, l'imputazione e l'espressione differenziale sono state eseguite mediante PIPE-T, un nuovo strumento Galaxy, sviluppato nel laboratorio di Biologia Molecolare dell'IRCCS Istituto Giannina Gaslini, che integra le funzioni implementate in diversi pacchetti R open-source in un unico strumento riutilizzabile,

trasparente e accessibile. I dati grezzi, che hanno superato i test di qualità, sono stati considerati accettabili sulla base dell'intervallo di espressione del ciclo soglia (Ct) 14-32. I valori Ct superiori a 32, inferiori a 14 o che non hanno superato i criteri di qualità dello strumento, sono stati classificati come indeterminati (NA). I dati sono stati normalizzati utilizzando l'U6, presente in 4 replicati tecnici nella Array Card. Il Ct medio di U6 è stato sottratto al Ct grezzo di ogni exo-miRNA del campione di riferimento. Poiché valori indeterminati possono influire negativamente sull'analisi a valle, sono stati filtrati Exo-miRNA normalizzati che eccedevano un numero prestabilito di NA. Gli NA degli Exo-miRNA che hanno superato il filtro sono stati imputati utilizzando il metodo di imputazione Mestdagh. Il metodo consiste nel sostituire ogni NA di un Exo-miRNA con un valore numerico stimato come il più basso valore di espressione di Exo-miRNA sottratto di un'unità log₂ aggiuntiva, al fine di omogeneizzare i dati per le successive fasi di elaborazione. Il p value è stato aggiustato per test di ipotesi multiple con il metodo Benjamini-Hochberg. Il Fold-change (FC) è stato calcolato per determinare l'entità delle differenze di espressione degli Exo-miRNA. Gli Exo-miRNA con un p value $\leq 0,05$ e FC ≥ 2 (up-regolato) o $\leq 0,5$ (down-regolato) sono stati considerati differenzialmente espressi in maniera significativa.

4.9 Trasfezione miRNA mimic

Nei nostri esperimenti sono stati utilizzati i miRCURY LNA (locked nucleic acids) miRNA mimic della QIAGEN.

Per effettuare la trasfezione è stato utilizzato il kit HiPerfect Transfection Reagent (QIAGEN), una miscela di lipidi cationici e neutri che consente l'assorbimento del miRNA mimic in esame e il suo rilascio efficiente all'interno delle cellule.

Sono state seminate 10^5 cellule per pozzetto di una piastra a 24 pozzetti in 0.5 ml di terreno di coltura contenente siero e antibiotici. Le cellule vengono a questo punto incubate in condizioni di crescita ottimali (37° e 5% di CO₂) per un paio di giorni per farle aderire alla piastra.

Il miR-501 mimic è stato aggiunto a 100 μ l di terreno di coltura senza siero contenente il reagente di trasfezione HiPerfect. La soluzione è stata incubata per 15 minuti a temperatura ambiente (15-25°C) per consentire la formazione dei complessi di trasfezione.

A questo punto i complessi vengono aggiunti alle cellule e la piastra viene ruotata delicatamente per garantire una distribuzione uniforme dei complessi di trasfezione nel terreno. Il terreno di coltura viene cambiato 24 ore dopo e le cellule vengono mantenute nelle normali condizioni di crescita. L'effetto del trattamento viene monitorato a vari tempi dopo la trasfezione.

4.10 Migrazione

La migrazione viene effettuata su multiwell da 24 pozzetti. 700 µl di RPMI contenente il 10 % FBS vengono aggiunti a ogni pozzetto. Le cellule (30000 cellule/pozzetto) vengono risospese in 100 µl di terreno contenente l'1% di FBS e seminate sulla membrana dei transwell (pori 8 µm) precedentemente trattata con fibronectina (SIGMA) a una concentrazione di 1 µg/ml a 4°C per una notte. La diversa concentrazione di siero FBS assicura la migrazione delle cellule dal transwell verso il pozzetto sottostante. La valutazione della migrazione viene effettuata dopo 4 e 6 ore di incubazione. Questa valutazione viene eseguita colorando le cellule presenti sulla parte inferiore del filtro, e quindi migrate.

Terminata l'incubazione, la parte superiore della membrana viene asciugata con cotton fioc prestando attenzione a non danneggiarla. Il transwell viene poi lavato due volte con 80 µl di PBS, pipettandolo sul lato del transwell e non direttamente sulla membrana.

A questo punto si procede con la colorazione delle cellule migrate utilizzando due coloranti specifici:

- Colorante May-Grumwald (senza diluizione)
- Colorante Giemsa (50 µl vengono diluiti in 1000 ml di acqua)

Per la colorazione, 590 µl di colorante May-Grumwald vengono aggiunti a ciascun campione e dopo 3 minuti di incubazione vengono aggiunti 590 µl di acqua a cui fa seguito una seconda incubazione di tre minuti. Il transwell viene poi lavato sotto acqua corrente (getto poco forte) e reinserito nel pozzetto. A questo punto 590 µl di colorante Giemsa vengono aggiunti a ciascun pozzetto. Dopo 20 minuti di incubazione. Dopo i transwell vengono lavati sotto acqua corrente e lasciati asciugare completamente prima di procedere all'osservazione al microscopio.

4.11 Colorazione con Falloidina

La falloidina è una tossina di origine fungina che può essere utilizzata per colorare i filamenti di actina del citoscheletro cellulare. Per la colorazione con falloidina, sono state seminate 150000 cellule in ogni camera di una chamber slide composta da quattro scomparti.

Trascorse 24 ore il fissaggio delle cellule è stato effettuato con 700 µl di 4% paraformaldeide in PBS a temperatura ambiente per 30 minuti.

Dopodiché la soluzione di fissaggio viene aspirata e si effettuano 3 lavaggi di 5 minuti ciascuno con 600 µl di PBS. L'eccesso di formaldeide viene tamponato utilizzando la glicina 0,1 M (600 µl).

Si effettuano altri tre lavaggi di cinque minuti con 500 μ l di PBS 600 μ l di Triton X-100 allo 0,1% in PBS vengono aggiunti alle cellule per 5 minuti per aumentare la permeabilità cellulare. Seguono 3 ulteriori lavaggi di 5 minuti in 600ul di PBS. Si aggiungono 600 ul di falloidina (1:400) per 45 minuti a temperatura ambiente.

Al termine, si effettuano altri tre lavaggi con PBS, si lascia asciugare qualche minuto e si le camere dal vetrino vengono rimosse. Si mette una goccia di Antifade Mounting Medium (Vectashield) con il colorante DAPI in ogni sezione, si copre con un vetrino copri oggetto e si procede con l'osservazione al microscopio a fluorescenza.

5 RISULTATI

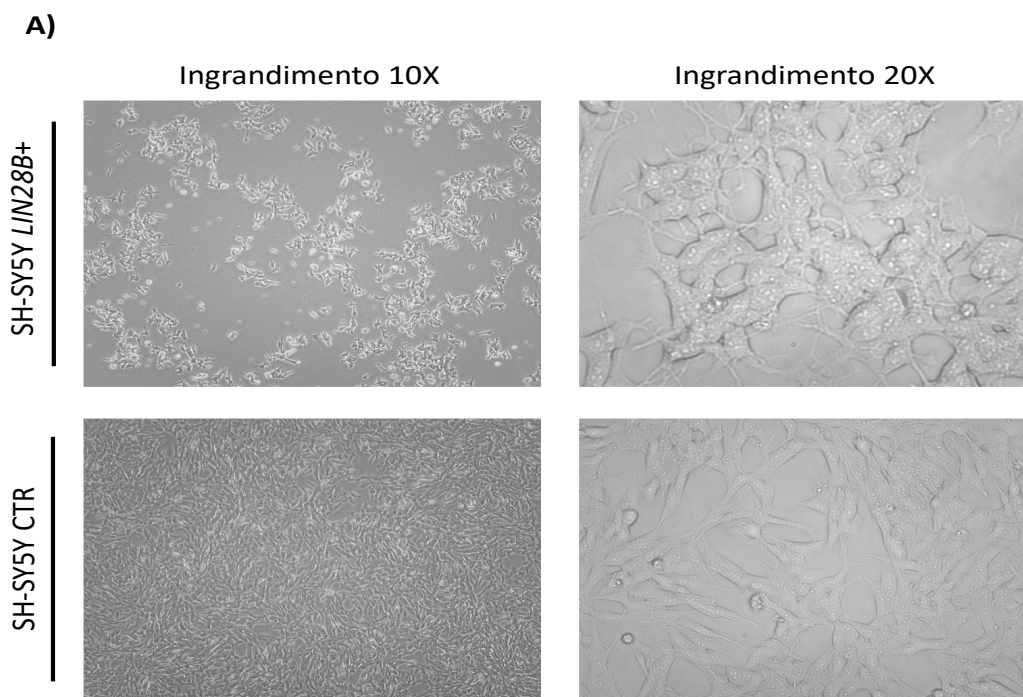
5.1 Caratterizzazione del modello cellulare SH *LIN28B*+

Il primo passaggio ha comportato l'analisi degli effetti della sovraespressione del gene *LIN28B* sulle cellule di NB SH-SY5Y.

5.1.1 Morfologia

Come primo obiettivo perseguito nella tesi abbiamo caratterizzato la morfologia delle cellule SH-SY5Y *LIN28B*+ dopo 7 giorni di induzione di espressione di *LIN28B* con doxiciclina rispetto a un gruppo di cellule di controllo non indotte. Abbiamo osservato le cellule inizialmente al microscopio ottico e successivamente colorate con falloidina, per la visualizzazione dei filamenti di actina. Dall'osservazione al microscopio ottico (**Figura 3A**) risulta evidente che l'espressione di *LIN28B* nelle cellule di neuroblastoma induce un netto cambiamento morfologico. Le cellule di controllo SH-SY5Y CTR hanno una morfologia più allungata rispetto alle SH-SY5Y *LIN28B*+ che mostrano invece un aspetto più cuboidale.

Le stesse caratteristiche si evidenziano nell'osservazione al microscopio a fluorescenza (**Figura 3B**), dove la forma cuboidale delle SH-SY5Y *LIN28B*+ è maggiormente visibile grazie al contrasto dato dalla falloidina che mette in risalto la forma della cellula colorando in rosso i filamenti di actina.



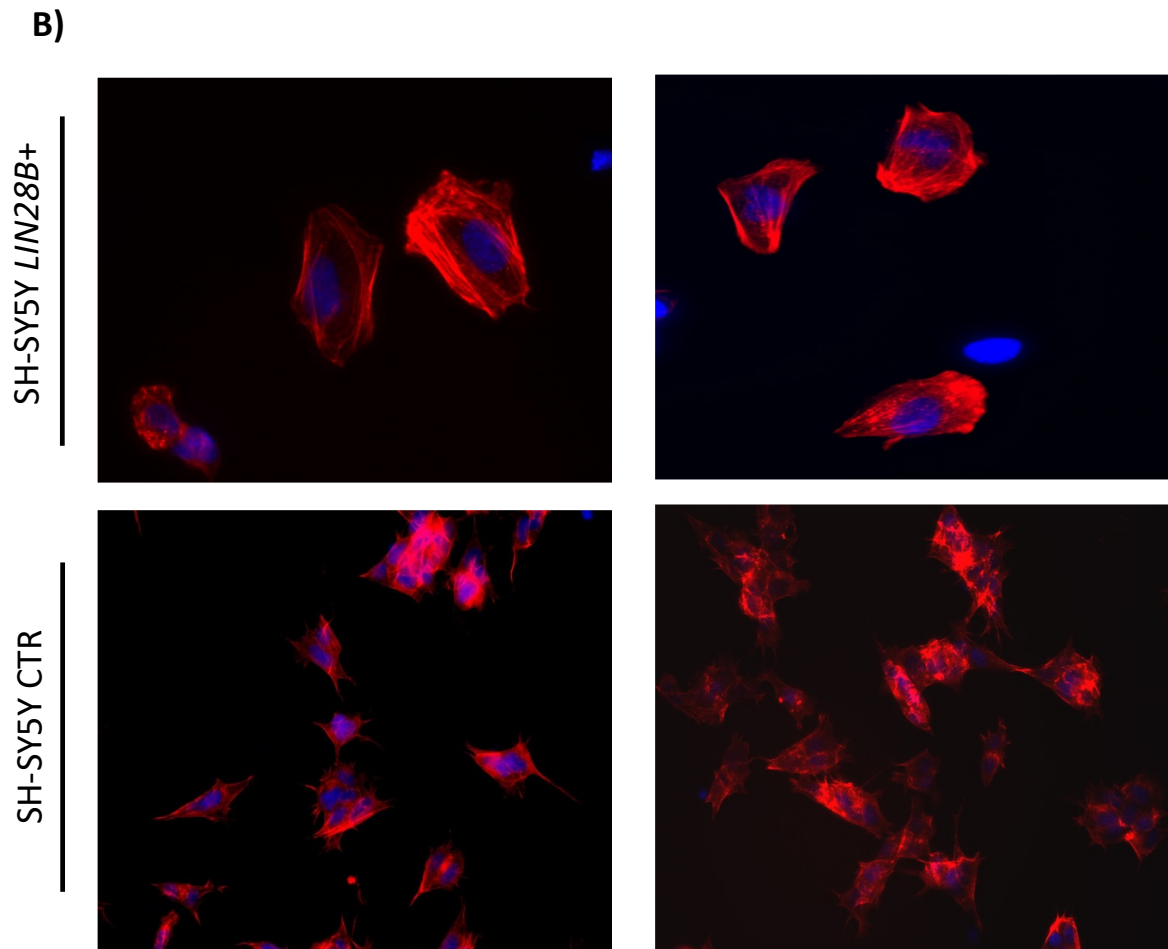


Figura 3. Differenze morfologiche tra cellule SH-SY5Y LIN28B+ e SH-SY5Y CTR

A) Immagini al microscopio ottico delle cellule SH-SY5Y LIN28B+ e CTR a due diversi ingrandimenti (10X e 20X). B) Immagini acquisite con microscopio a fluorescenza delle cellule SH-SY5Y LIN28B+ e CTR dopo la colorazione con falloidina a ingrandimento 40X.

5.1.2 Migrazione SH-SY5Y *LIN28B*⁺

Per verificare se la sovraespressione del gene *LIN28B* aumenta le capacità invasive delle cellule di NB, abbiamo valutato la capacità, di migrazione delle cellule SHSY5Y *LIN28B*⁺ rispetto alle cellule di controllo SH-SY5Y CTR. La migrazione è stata osservata a 4 e 6 ore.

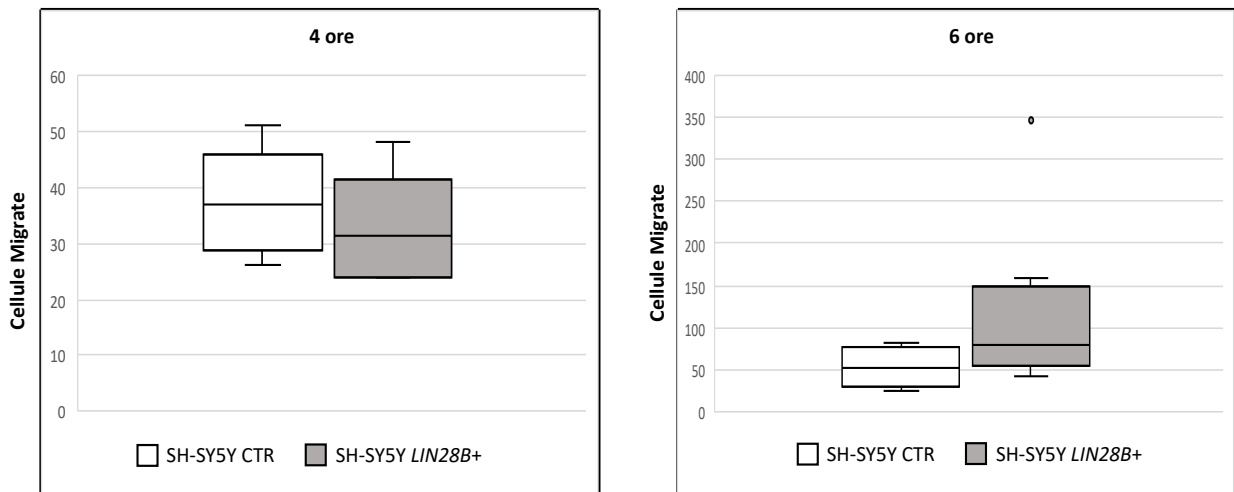


Figura 4. Capacità migratorie di cellule SH-SY5Y *LIN28B*⁺ e SH-SY5Y

Grafici box plot indicativi della migrazione cellulare dopo 4 e 6 ore. In bianco sono rappresentate le cellule di SH-SY5Y CTR, mentre in grigio sono rappresentate le cellule SH-SY5Y *LIN28B*⁺. Sull'asse delle ordinate è riportato il numero di cellule migrate.

Come mostrato dai grafici box plot (**Figura 4**), a quattro ore non abbiamo riscontrato alcuna differenza significativa nella migrazione tra le cellule SHSY5Y *LIN28B*⁺ e le cellule di CTR. Tuttavia, a 6 ore, le cellule sovraesprimenti *LIN28B* hanno riportato un tasso di migrazione molto più elevato e significativo (p value = 0,05). Questi dati sono coerenti con le caratteristiche morfologiche osservate nelle cellule SH-SY5Y *LIN28B*⁺ (Figura 3) in cui il riarrangiamento dei microfilamenti di actina è indice di una aumentata motilità cellulare (49). Abbiamo quindi concluso che il gene *LIN28B* svolge un ruolo importante nella trasformazione neoplastica.

5.2 Analisi esosomi derivati da cellule SH *LIN28B*⁺

Per determinare se la sovraespressione del gene *LIN28B* influenzi anche l'espressione dei miRNA, abbiamo misurato il profilo di espressione dei miRNA esosomiali in cellule SHSY5Y *LIN28B*⁺ rispetto alle cellule SHSY5Y di controllo.

Dopo aver isolato gli esosomi dal terreno di coltura cellulare, ne abbiamo analizzato il contenuto di miRNA attraverso una Real-Time PCR, che ci ha permesso di identificare gli exo-miRNA differenzialmente espressi in seguito all'induzione con doxyciclina. I risultati sono riportati nella **Tabella 5**.

Tabella 5. miRNA differenzialmente espressi in seguito alla sovraespressione di *LIN28B*.

miRNA up-regolati	FC	miRNA down-regolati	FC
hsa-miR-92a-3p	2,98	hsa-miR-203-3p	0,49
hsa-miR-501-5p	2,38	hsa-miR-376a-3p	0,48
hsa-miR-874-3p	2,20	hsa-miR-127-3p	0,48
hsa-miR-138-5p	2,18	hsa-miR-10a-5p	0,47
hsa-miR-375-3p	2,12	hsa-miR-204-5p	0,47
hsa-miR-361-5p	1,98	hsa-miR-122-5p	0,47
hsa-miR-422a	1,84	hsa-miR-150-5p	0,47
hsa-miR-128a-3p	1,74	hsa-miR-576-3p	0,47
hsa-miR-330-3p	1,72	hsa-miR-155-002623	0,46
hsa-miR-95-3p	1,66	hsa-miR-411-5p	0,45
hsa-miR-532-5p	1,58	hsa-miR-486-5p	0,42
hsa-miR-139-3p	1,53	hsa-miR-382-5p	0,39
hsa-miR-671-3p	1,53	hsa-miR-539-5p	0,35
hsa-miR-660-5p	1,52	hsa-miR-29b-3p	0,31
hsa-miR-125b-5p	1,51		

Il Fold Change (FC) esprime il grado di espressione differenziale misurata: gli exo-miRNA sono considerati up-regolati in seguito alla sovraespressione di *LIN28B* se hanno un $FC \geq 1.5$, mentre sono considerati down-regolati se hanno un $FC \leq 0.5$.

Per determinare la funzione biologica degli exo-miRNA differenzialmente espressi, abbiamo eseguito una pathway analysis utilizzando il programma online miRNet. La pathway analysis si basa sull'applicazione di algoritmi per fornire una rappresentazione grafica dei meccanismi molecolari in

cui sono coinvolte molecole di interesse. Nel nostro caso è stata applicata agli exo-miRNA per determinare i processi cellulari in cui sono coinvolti. I risultati, riportati in **Tabella 6**, hanno dimostrato che gli exo-miRNA identificati sono associati all'aggressività tumorale.

Tabella 6. Principali processi cellulari in cui sono coinvolti gli exo-miRNA identificati.

Processo biologico	
Formazione di filamenti di actina	Migrazione cellulare
Risposta al danno del DNA	Onco-miRNAs
Riparazione del danno al DNA	Angiogenesi
Differenziamento neuronale	Infiemmazione
Differenziamento cellulare	Metabolismo lipidico
Risposta immunitaria	Proliferazione cellulare
Ciclo cellulare	Apoptosi

Visto il coinvolgimento degli exo-miRNA modulati nella trasformazione neoplastica, abbiamo deciso di selezionare sei exo-miRNA (**Figura 5**) per eseguire degli studi funzionali in vitro che validino il loro ruolo biologico nel neuroblastoma. I miRNA sono stati scelti perché già caratterizzati per il loro coinvolgimento in processi tumorali

- **hsa-miR-92a-3p**: Oncogene che inibisce la secrezione dell'oncosoppressore *Dickkopf-1* (*DKK1*) nel neuroblastoma (50).
- **hsa-miR-501-5p**: Oncogene che promuove la crescita e la migrazione cellulare, inoltre, il trasferimento tramite esosomi del miRNA, conferisce resistenza alla doxorubicina (51,52).
- **hsa-miR-375-3p**: Oncogene i cui alti livelli di espressione esosomiale sono associati a fenotipo metastatico aggressivo (53).
- **hsa-miR-411-5p**: Oncosoppressore che inibisce la proliferazione e la metastatizzazione (54).
- **hsa-miR-382-5p**: Oncosoppressore che inibisce la crescita tumorale e sensibilizza le cellule tumorali ai farmaci (55).
- **hsa-miR-539-5p**: Oncosoppressore che inibisce la proliferazione e la migrazione cellulare (56).

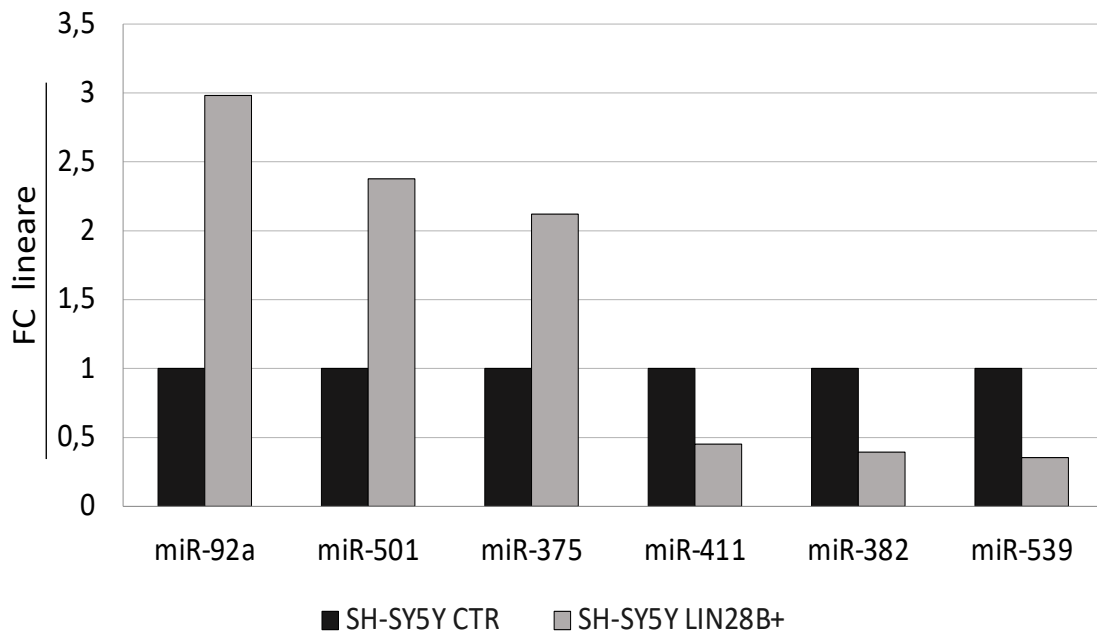


Figura 5. Espressione dei miRNA selezionati.

Istogramma che rappresenta l'espressione dei sei exo-miRNA scelti e mostra come siano modulati nelle cellule SH-SY5Y LIN28B+ rispetto alle cellule di controllo. Sull'asse delle ordinate è riportato il fold change (FC) lineare

Gli studi funzionali in vitro si basano sulla reversione del fenotipo indotto dalla sovraespressione di *LIN28B* nelle cellule *SH-SY5Y* attraverso l'utilizzo di molecole miRNA mimic e inhibitor, che inducono o inibiscono, rispettivamente, l'espressione del miRNA di interesse. Abbiamo definito prima di tutto le condizioni sperimentali ottimali per la trasfezione della molecola miRNA mimic. Il primo miRNA utilizzato per effettuare questi esperimenti è stato il miR-501-5p, che in cellule che sovraesprimono il gene *LIN28B+* è risultato up-regolato. Ci aspettiamo, quindi, che una sua sovraespressione in cellule *SH-SY5Y CTR* porti a un fenotipo tumorale simile a quello riscontrato nelle cellule *SHSY5Y LIN28B+*.

Le cellule *SHSY5Y CTR* le abbiamo trasfettate con diverse concentrazioni di miR-501 mimic, in particolare, 0.1nM; 0.15nM; 0.25nM; 2nM e 3nM. Dopo 24h dalla trasfezione, per determinare quale fosse la concentrazione più efficace, abbiamo valutato l'espressione del miR-501 nelle cellule attraverso una RTqPCR, comparando i valori ottenuti nelle cellule trasfettate con il miR-501-5p mimic con quelli riportati nelle cellule non trasfettate. I risultati (**Figura 6**) mostrano come la concentrazione 3nM consenta di ottenere la sovraespressione più significativa del miR-501.

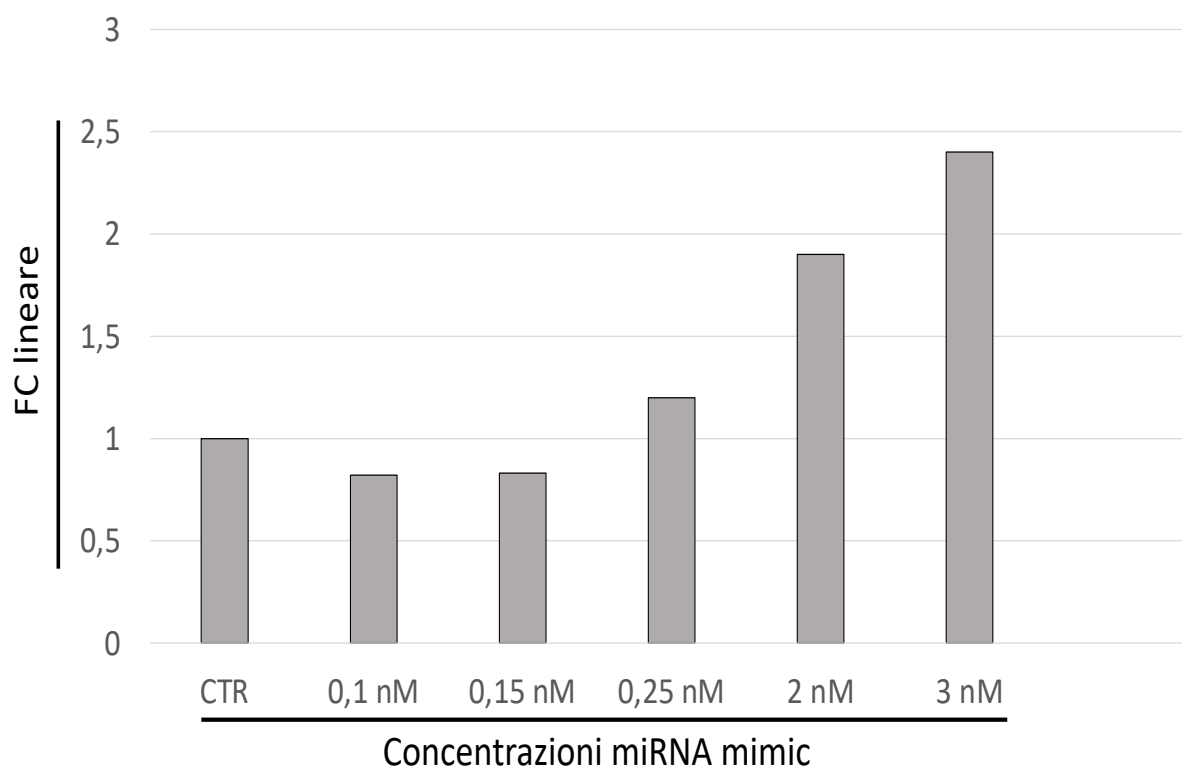


Figura 6. Concentrazioni del miRNA 501-5p.

Il grafico mostra i valori di espressione del miRNA 501-5p dopo 24 dalla trasfezione in cellule SH-SY5Y CTR di miRNA 501-5p mimic alle diverse concentrazioni indicate. Sull'asse delle ordinate è riportato il fold change (FC) lineare

Poiché la trasfezione è un trattamento potenzialmente tossico per le cellule, parallelamente abbiamo valutato la vitalità cellulare tramite saggio MTT 24 ore dopo la trasfezione con le diverse concentrazioni di miR-501-5p mimic. I risultati dimostrano che nessuna delle concentrazioni utilizzate ha causato una citotossicità significativa (**Figura 7**). Per effettuare i successivi esperimenti funzionali abbiamo quindi selezionato la concentrazione 3nM che consentiva di ottenere l'espressione più elevata del miR-501 senza significativa tossicità cellulare.

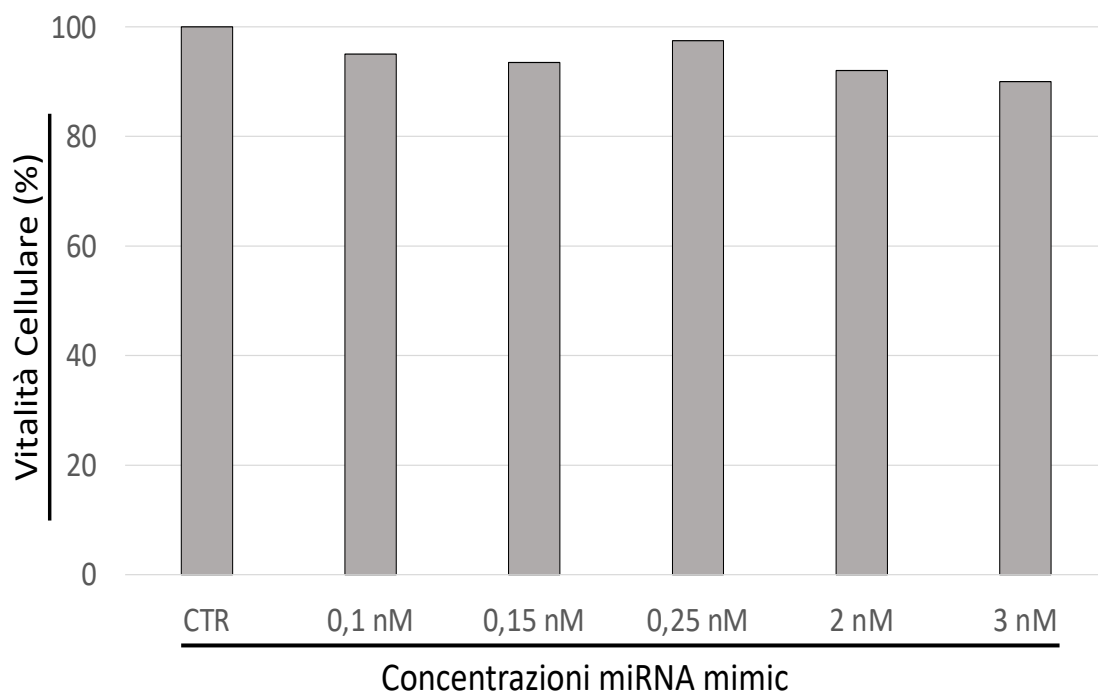


Figura 7. Valutazione della citotossicità.

Valutazione della vitalità cellulare tramite saggio MTT dopo 24 ore dalla trasfezione con miR-501 mimic a diverse concentrazioni. Sull'asse delle ordinate è riportata la vitalità cellulare espressa in percentuale.

Abbiamo quindi verificato la durata della modulazione del miR-501 in seguito alla trasfezione con il relativo miRNA mimic. A tale scopo l'espressione del miR-501 nelle cellule SH-SY5Y di CTR è stata misurata tramite RTqPCR 48, 72, 96 ore e 7 giorni dopo la trasfezione. Il grafico riportato in **Figura 8** mostra come una upregolazione significativa del miR-501 venga mantenuta fino a 7 giorni dopo la trasfezione, definendo un'ampia finestra di tempo in cui possono essere valutati gli effetti biologici della trasfezione.

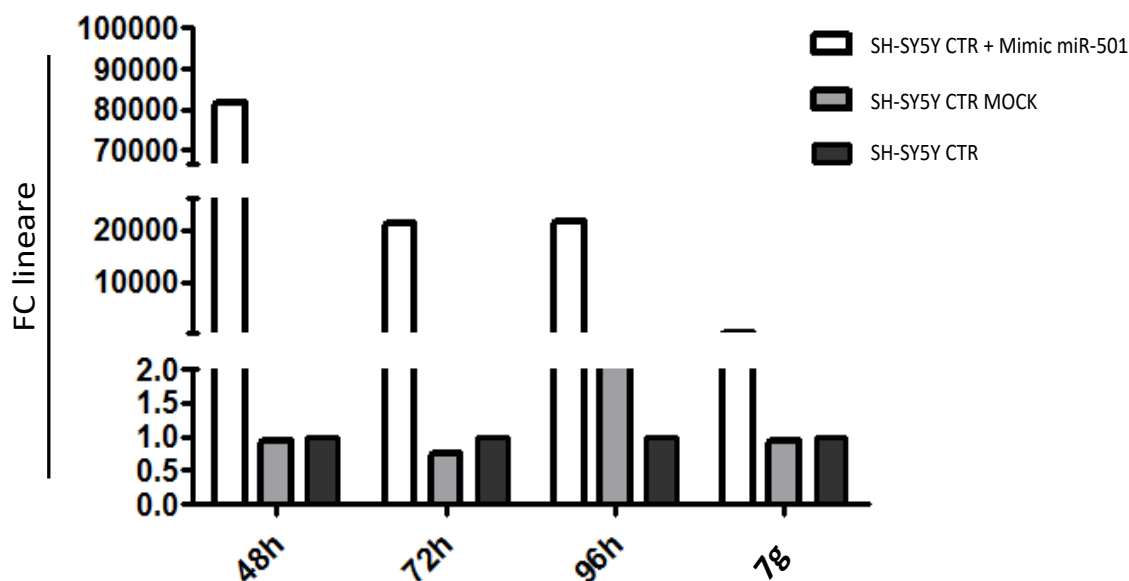


Figura 8. Valutazione della durata degli effetti di trasfezione.

Misura dell'espressione del miR-501 48, 72, 96 ore e 7 giorni dopo la trasfezione in cellule SHSY-5Y CTR. Sull'asse delle ordinate è riportato il Fold change (FC) lineare

Dopo aver definito le condizioni sperimentali più idonee, abbiamo valutato la reversione del fenotipo delle cellule SH-SY5Y CTR in seguito alla trasfezione. Per definire la reversione del fenotipo abbiamo analizzato la migrazione. Abbiamo infatti dimostrato che le cellule SH-SY5Y *LIN28B+* possiedono alti livelli di espressione di exo-miR-501 associati a un aumentato della capacità di migrazione. Di conseguenza, l'induzione dell'espressione del miR-501 dovrebbe causare un passaggio delle cellule SH-SY5Y a un fenotipo più aggressivo con aumentate capacità migratorie. La valutazione della migrazione l'abbiamo effettuata 48 e 72 ore dopo la trasfezione, tempistiche in cui la modulazione del miR-501 ha dato i risultati più significativi (**Figura 8**).

Come si può osservare nella **Figura 9**, a 48 ore dalla trasfezione non si nota un incremento della migrazione nelle cellule SH-SY5Y di CTR paragonabile ai livelli osservati nelle cellule SH-SY5Y *LIN28B+*.

Al contrario, a 72 ore dalla trasfezione, il numero di cellule migrate nelle cellule SH-SY5Y di CTR trasfettate, raggiunge un valore equiparabile a quello osservato per le cellule SH-SY5Y *LIN28B+*. I risultati dimostrano che l'induzione della sovraespressione del miR-501 è quindi in grado di

conferire un fenotipo tumorale più aggressivo alle cellule SH-SY5Y di CTR e che quindi il miR-501 possiede un'attività pro-tumorale promuovendo la migrazione cellulare.

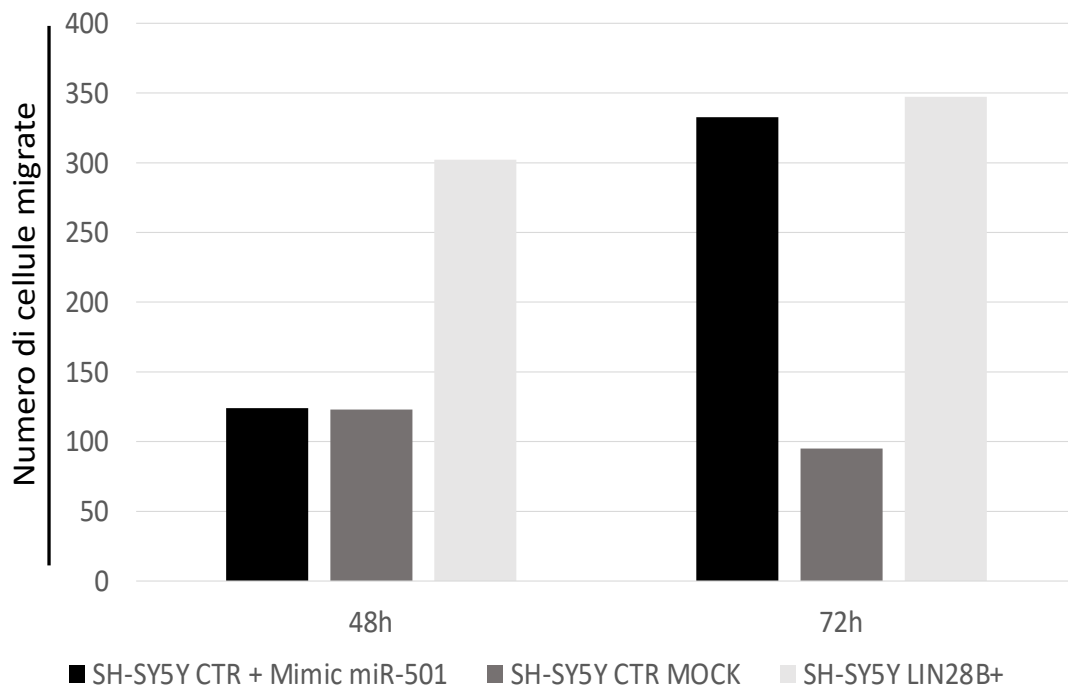


Figura 9. Migrazione delle cellule SH-SY5Y CTR

Il grafico rappresenta la migrazione delle cellule SH-SY5Y CTR 48h e 72h dopo la trasfezione con il miRNA mimic 501-5p a confronto con le cellule SH-SY5Y LIN28B+. L'asse delle ordinate riporta il numero delle cellule migrate.

Sulla base di questi risultati saranno effettuati ulteriori esperimenti utilizzando gli altri miRNA selezionati per confermare il loro ruolo pro-tumorale. Se tale ipotesi verrà confermata, questi miRNA potranno essere utili in ambito clinico come bersaglio per nuovi trattamenti terapeutici.

6 CONCLUSIONI

L'obiettivo di questo lavoro è stata la caratterizzazione del profilo di espressione dei miRNA esosomiali in cellule umane di neuroblastoma, al fine di identificare nuovi biomarcatori molecolari che possano essere utili per sviluppare nuovi approcci terapeutici più efficaci in pazienti con neuroblastoma ad alto rischio.

Per prima cosa, abbiamo caratterizzato il modello cellulare utilizzato, ovvero la linea cellulare SH-SY5Y ingegnerizzata per sovraesprimere il gene *LIN28B* in seguito ad induzione con doxiciclina. Questo studio ha dimostrato come la sovraespressione di questo gene in cellule SH-SY5Y aumenti il loro fenotipo migratorio e induca sostanziali cambiamenti morfologici in cui la struttura di actina conferisce una forma cellulare più poligonale rispetto al controllo. I risultati sono in linea con i dati riportati dalla letteratura secondo cui *LIN28B* è una proteina che lega l'RNA e blocca let-7, una famiglia di microRNA noti per inibire la tumorigenesi. Il conseguente effetto è un'aumentata proliferazione cellulare correlata a una scarsa sopravvivenza nei pazienti (31).

Abbiamo dimostrato che questi cambiamenti correlano con un'induzione dell'EMT, aumentando l'invasività cellulare, cioè la capacità di diffondersi nell'organismo e di penetrare nei tessuti riuscendo a formare metastasi caratteristiche del tumore ad alto rischio (33).

Dopo aver definito il modello cellulare, abbiamo studiato il profilo di espressione dei miRNA esosomiali rilasciati dalle cellule di neuroblastoma. L'analisi ha portato all'identificazione di 29 miRNA differenzialmente espressi in seguito alla sovraespressione di *LIN28B*.

Abbiamo quindi eseguita una pathway analysis per evidenziare se i miRNA identificati fossero coinvolti in processi cellulari associati alla progressione tumorale.

Sulla base della nostra analisi e del loro ruolo biologico, abbiamo selezionato sei miRNA per effettuare i successivi esperimenti di reversione del fenotipo con lo scopo di dimostrare come questi miRNA possano essere coinvolti direttamente nella regolazione della crescita tumorale.

I sei miRNA che sono stati selezionati sono già stati associati al tumore:

- Hsa-miR-92a-3p è un membro del cluster oncogenico miR17-92 che consiste in sei miRNA co-espressi (50). I membri di questo cluster espressi in modo aberrante promuovono la tumorigenicità nel neuroblastoma. In particolare, il miRNA hsa-miR-92a-3p inibisce l'espressione di DKK, un soppressore tumorale che nel neuroblastoma umano ha anche significato prognostico. Nelle cellule di neuroblastoma con MYCN amplificato si può avere un'aumentata espressione del miR-92a, riducendo maggiormente l'espressione della

proteina DKK (50). I risultati ottenuti mostrano una up-regolazione del miR-92a negli esosomi delle cellule SH-SY5Y *LIN28B+*.

- Hsa-miR-501-5p, se up-regolato, come è stato dimostrato dai risultati ottenuti, promuove la proliferazione, la migrazione e l'invasività cellulare (51). È stato riportato, inoltre, che il miR-501 viene trasferito direttamente attraverso gli esosomi rilasciati dalle cellule donatrici e assunto dalle cellule riceventi per aumentare la resistenza alla doxorubicina (antraciclina che rallenta o blocca la crescita delle cellule tumorali legandosi al DNA) e favorire la tumorigenesi, inducendo quindi chemioresistenza e tratti fenotipici maligni (52).
- Hsa-miR-375-3p è up-regolato negli esosomi delle cellule SH-SY5Y *LIN28B+*. Una maggiore espressione di questo miRNA è correlata con l'insorgenza di metastasi. Infatti, la sovrappressione di questo miRNA inibisce l'autofagia e riduce l'attività delle cellule dendritiche che presentano l'antigene del tumore, promuovendo un ambiente immunosoppressivo e permettendogli quindi di sfuggire all'immunosorveglianza come spesso accade nei tumori avanzati. miR-375 sembra essere coinvolto anche nelle risposte infiammatorie e neoangiogeniche aumentando così l'aggressività del cancro (53).
- Hsa-miR-411-5p se down-regolato favorisce proliferazione, migrazione e invasione delle cellule tumorali. L'espressione ectopica del miRNA ha dimostrato l'effetto contrario sopprimendo drasticamente la migrazione. Inoltre, la sua sovraespressione è in grado di inibire i livelli di mRNA della proteina GRB2, un adattatore chiave che svolge un ruolo principale nella via di segnalazione oncogenica di Ras (54). Anche negli esosomi delle cellule SH-SY5Y *LIN28B+* è stata osservata una riduzione dei livelli di miR-411-5p
- Hsa-miR-382-5p è un altro miRNA che risulta downregolato negli esosomi delle cellule SH-SY5Y *LIN28B+*. Secondo un recente studio questo miRNA potrebbe ridurre la crescita cellulare e migliorare la chemiosensibilità. In particolare, è stato identificato un legame regolatorio tra miR-382 e KFL2/HIPK3, una proteina coinvolta nella sopravvivenza cellulare e la cui espressione elevata corrisponde a una prognosi sfavorevole e alla chemioresistenza. La sovraespressione del miRNA indurrebbe una diminuzione dell'espressione di KFL2/HIPK3 inibendo la metastatizzazione tumorale e inducendo una maggior sensibilità alla chemioterapia. Pertanto, il miR-382 può essere considerato un soppressore tumorale e un chemiosensibilizzatore e potrebbe avere un valore significativo come indicatore di progressione tumorale (55).

- Hsa-miR-539-5p il terzo dei miRNA down-regolati negli esosomi delle cellule SH-SY5Y *LIN28B+*, è un importante miRNA che interferisce con la progressione di diversi tumori. Le sue basse espressioni sono infatti risultate associate in modo significativo allo stadio avanzato del tumore, alle metastasi o alla ridotta sopravvivenza complessiva dei pazienti. Il miR-539 ha una correlazione inversa con LAMA4, una glicoproteina della matrice extracellulare la cui espressione correla direttamente con un'ampia varietà di processi patologici, tra cui migrazione, metastasi, adesione cellulare (56).

Per gli esperimenti di reversione del fenotipo abbiamo definito prima di tutto le condizioni sperimentali ottimali per la trasfezione, concludendo che una concentrazione pari a 3nM consente di ottenere la maggiore modulazione del miRNA mimic senza causare tossicità alle cellule. La modulazione significativa del miRNA mimic trasfettato si mantiene fino a sette giorni dalla trasfezione, consentendo di effettuare gli esperimenti funzionali durante un'ampia finestra temporale.

Avendo definito queste condizioni, abbiamo effettuato gli esperimenti di trasfezione per valutare la reversione del fenotipo nelle cellule SH-SY5Y CTR. Abbiamo dimostrato che la up-regolazione del miR-501 causa un aumento significativo della motilità delle cellule SH-SY5Y CTR, le quali, a 72 ore dalla trasfezione, hanno riportato un livello di migrazione paragonabile a quello osservato nelle cellule SH-SY5Y *LIN28B+*.

I risultati, quindi, confermano la nostra ipotesi per cui l'exo-miR-501 mostra un'attività pro-tumorale promuovendo la migrazione cellulare e l'induzione della sua sovraespressione conferisce un fenotipo più aggressivo alle cellule SH-SY5Y CTR.

Ulteriori esperimenti sono necessari per confermare il ruolo pro-tumorale degli altri 5 miRNA selezionati. Se questi dati venissero confermati, tali miRNA potrebbero avere un risvolto in ambito clinico come bersagli per nuovi trattamenti terapeutici.

7 REFERENZE

1. Matthay KK, Maris JM, Schleiermacher G, Nakagawara A, Mackall CL, Diller L, et al. Neuroblastoma. *Nat Rev Dis Primer*. 2016.
2. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *Lancet*. 2007. 369(9579):2106-20
3. Whittle SB, Smith V, Doherty E, Zhao S, McCarty S, Zage PE. Overview and recent advances in the treatment of neuroblastoma. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2017. 17(4):369-386
4. Tolbert VP, Matthay KK. Neuroblastoma: clinical and biological approach to risk stratification and treatment. *Cell Tissue Res*. 2018. 372(2):195-209
5. Buhagiar A, Ayers D. Chemoresistance, Cancer Stem Cells, and miRNA Influences: The Case for Neuroblastoma. *Anal Cell Pathol Amst*. 2015. 2015:150634
6. Pinto, N. R., Applebaum, M. A., Volchenboum, S. L., Matthay, K. K., London, W. B., Ambros, P. F., Nakagawara, A., Berthold, F., Schleiermacher, G., Park, J. R., Valteau-Couanet, D., Pearson, A. D. & Cohn, S. L. Advances in Risk Classification and Treatment Strategies for Neuroblastoma. *Journal of clinical oncology*. 2015. 33(27):3008-17
7. Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, Brisse HJ, Cecchetto G, Holmes K, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol*. 2009. 27(2):298-303
8. Zafar A, Wang W, Liu G, Wang X, Xian W, McKeon F, Foster J, Zhou J, Zhang R. Molecular targeting therapies for neuroblastoma: Progress and challenges. *Med Res Rev*. 2021. 41(2):961-1021
9. Smith Valeria, and Jennifer Foster. "High-Risk Neuroblastoma Treatment Review." *Children*. 2018. 5(9):114
10. Louis CU, Shohet JM. Neuroblastoma: Molecular Pathogenesis and Therapy. *Annu Rev Med*. 2015. 66:49-63
11. Tomolonis, J.A., Agarwal, S. & Shohet, J.M. Neuroblastoma pathogenesis: deregulation of embryonic neural crest development. *Cell Tissue Res*. 2018. 372(2):256-262
12. Manrong Jiang, Jennifer Stanke, Jill M. Lahti. The Connections Between Neural Crest Development and Neuroblastoma. *Current Topics in Developmental Biology*. 2011. 94:77-127
13. Pugh TJ, Morozova O, Attiyeh EF, et al. The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nat Genet*. 2013. 45(3):279-84

14. De Preter K, Vermeulen J, Brors B, et al. Accurate outcome prediction in neuroblastoma across independent data sets using a multigene signature. *Clin Cancer Res*. 2010. 16(5):1532-1541
15. Johnsen JI, Dyberg C, Wickström M. Neuroblastoma—A Neural Crest Derived Embryonal Malignancy. *Front Mol Neurosci*. 2019. 12:9
16. Barr EK, Applebaum MA. Genetic Predisposition to Neuroblastoma. *Children*. 2018. 5(9):119
17. Hirschhorn JN, Daly MJ. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet*. 2005. 6(2):95-108
18. Tolbert VP, Coggins GE, Maris JM. Genetic susceptibility to neuroblastoma. *Curr Opin Genet Dev*. 2017. 42:81-90
19. Cheung, NK., Dyer, M. Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2013. 13(6):397-411
20. Tonini GP, Capasso M. Genetic predisposition and chromosome instability in neuroblastoma. *Cancer Metastasis Rev*. 2020. 39(1):275-285
21. Azarova, A.M., Gautam, G., George, R.E. Emerging importance of ALK in neuroblastoma. *Semin. Cancer Biol*. 2011. 21(4):267-75
22. Schlisio S., Kenchappa R.S., Vredeveld, L.C., George, R.E., Stewart, R., Greulich, H., Shahriari, K., Nguyen, N.V., Pigny, P., Dahia, P.L.; et al. The kinesin KIF1B β acts downstream from Egln3 to induce apoptosis and is a potential 1p36 tumor suppressor. *Genes Dev*. 2008.
23. Ritenour LE, Randall MP, Bosse KR, Diskin SJ. Genetic susceptibility to neuroblastoma: current knowledge and future directions. *Cell Tissue Res*. 2018. 372(2):287-307
24. Wang K, Diskin SJ, Zhang H, Attiyeh EF, Winter C, Hou C, Schnepf RW, Diamond M, Bosse K, Mayes PA, et al. Integrative genomics identifies LMO1 as a neuroblastoma oncogene. *Nature*. 2011. 469(7329):216-20
25. Diskin SJ, Capasso M, Schnepf RW, Cole KA, Attiyeh EF, Hou C, Diamond M, Carpenter EL, Winter C, Lee H, et al. Common variation at 6q16 within HACE1 and LIN28B influences susceptibility to neuroblastoma. *Nat Genet*. 2012.
26. Trigg RM, Turner SD. ALK in Neuroblastoma: Biological and Therapeutic Implications. *Cancers* 2018. 44(10):1126-30
27. Bresler, S.C.; Weiser, D.A.; Huwe, P.J.; Park, J.H.; Krytska, K.; Ryles, H.; Laudenslager, M.; Rappaport, E.F.; Wood, A.C.; McGrady, P.W.; et al. ALK mutations confer differential oncogenic activation and sensitivity to ALK inhibition therapy in neuroblastoma. *Cancer Cell* 2014. 26(5):692-94

28. Huang M, Weiss WA. Neuroblastoma and MYCN. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013. 3(10):a014415
29. Newhart A, Rafalska-Metcalf IU, Yang T, Negorev DG, Janicki SM. Single-cell analysis of Daxx and ATRX-dependent transcriptional repression. *J Cell Sci.* 2012. 125(Pt22):5489-501
30. Lerone M, Ognibene M, Pezzolo A, Martucciello G, Zara F, Morini M, Mazzocco K. Molecular Genetics in Neuroblastoma Prognosis. *Children.* 2021. 8(6):456
31. Robert W. Schnepf & Sharon J. Diskin LIN28B: an orchestrator of oncogenic signaling in neuroblastoma, *Cell Cycle*, 2016. 15(6):772-4
32. Molenaar JJ, Domingo-Fernández R, Ebus ME, Lindner S. et al. LIN28B induces neuroblastoma and enhances MYCN levels via let-7 suppression. *Nat Genet.* 2012. 44(11):1199-206
33. Corallo, D., Donadon, M., Pantile, M. et al. LIN28B increases neural crest cell migration and leads to transformation of trunk sympathoadrenal precursors. *Cell Death Differ.* 2020. 27(4):1225-1242
34. Siravegna, G.; Marsoni, S.; Siena, S.; Bardelli, A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2017. 14(9):531-548
35. Yu X, Odenthal M, Fries JW. Exosomes as miRNA Carriers: Formation-Function-Future. *Int J Mol Sci.* 2016. 17(12):2028
36. Simons M et al. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol.* 2009. 21(4):575-81
37. Liao J. et al. Expression profiling of exosomal miRNAs derived from human esophageal cancer cells by Solexa high-throughput sequencing. *Int J Mol Sci* 2014. 15(9):15530-51
38. Erik R Abels et al. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell Mol Neurobiol* 2016. 36(3):301-12
39. Sybren L.N. Maas et al. Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends Cell Biol.* 2017. 27(3):172-188
40. Zhang J. et al. Exosome and exosomal microRNA trafficking, sorting, and function. *Genomic proteomics bioinformatics* 2015. 13(1):17-24
41. Padda J, Khalid K, Khedr A, Patel V, Al-Ewaidat OA, Tasnim F, Padda S, Cooper AC, Jean-Charles G. Exosome-Derived microRNA: Efficacy in Cancer. *Cureus.* 2021. 13(8):e17441
42. Bhaskaran M. et al. MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Vet Pathol.* 2014. 51(4):759-74

43. Yamakuchi M, Lowenstein CJ. MiR-34, SIRT1 and p53: the feedback loop. *Cell Cycle*. 2009. 8(5):712-5
44. Aravindan N, Subramanian K, Somasundaram DB, Herman TS, Aravindan S. MicroRNAs in neuroblastoma tumorigenesis, therapy resistance, and disease evolution. *Cancer Drug Resist*. 2019. 2(4):1086-1105
45. Galardi, A.; Colletti, M.; Di Paolo, V.; Vitullo, P.; Antonetti, L.; Russo, I.; Di Giannatale, A. Exosomal MiRNAs in Pediatric Cancers. *Int. J. Mol. Sci*. 2019. 20(18):4600
46. Morini M, Cangelosi D, Segalerba D, Marimpietri D, Raggi F, Castellano A, et al. Exosomal microRNAs from Longitudinal Liquid Biopsies for the Prediction of Response to Induction Chemotherapy in High-Risk Neuroblastoma Patients: A Proof-of-Concept SIOPEX Study. *Cancers*. 2019. 11(10):1476
47. June L, Biedler, Suzanne Roffler-Tarlov, Melitta Schachner, Lewis S. Freedman; Multiple Neurotransmitter Synthesis by Human Neuroblastoma Cell Lines and Clones. *Cancer Res*. 1978. 38(11Pt1):3751-7
48. James Ruffels, Martin Griffin, John M. Dickenson, Activation of ERK1/2, JNK and PKB by hydrogen peroxide in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of ERK1/2 in H₂O₂-induced cell death. 2004. 483(2-3):16373
49. Mitchison TJ, Cramer LP. Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell*. 1996. 84(3):371-9
50. Bjørn Helge Haug, Jørn R. Henriksen, Jochen Buechner, Dirk Geerts, Ellen Tømte, Per Kogner, Tommy Martinsson, Trond Flægstad, Baldur Sveinbjørnsson, Christer Einvik, MYCN-regulated miRNA-92 inhibits secretion of the tumor suppressor DICKKOPF-3 (DKK3) in neuroblastoma, *Carcinogenesis*. 2011. Volume 32. Issue 7. Pages 1005-1012
51. Jaceline Gislaine Pires Sanches, Yunchao Xu, Iddrisu Baba Yabasin, Min Li, Ying Lu, Xiaoxin Xiu, Lu Wang, Limin Mao, Jie Shen, Bo Wang, Li Hou, Jingfang Ju, Junjun Zhao, Bo Song, miR-501 is upregulated in cervical cancer and promotes cell proliferation, migration and invasion by targeting CYLD, *Chemico-Biological Interactions*, 2018. 286:85-95
52. Xu Liu, Ying Lu, Yunchao Xu, Sizhu Hou, Jinli Huang, Bo Wang, Jinyao Zhao, Shilin Xia, Shujun Fan, Xiaotang Yu, Yue Du, Li Hou, Zhiyue Li, Zijie Ding, Shuo An, Bo Huang, Lianhong Li, Jianwu Tang, Jingfang Ju, Hongwei Guan, Bo Song, Exosomal transfer of miR-501 confers doxorubicin resistance and tumorigenesis via targeting of BLID in gastric cancer, *Cancer Letters*, 2019. 459:122-134

53. Sebastian Meltzer, Tonje Bjørnstrøm, Lars Gustav Lyckander, Kjersti Flatmark, Svein Dueland, Rampradeep Samiappan, Christin Johansen, Erta Kalanxhi, Anne Hansen Ree, Kathrine Røe Redalen, Circulating Exosomal miR-141-3p and miR-375 in Metastatic Progression of Rectal Cancer, *Translational Oncology*, 2019. 12(8):1038-1044
54. Yunda Zhang, Guoxing Xu, Gang Liu, Yongzhi Ye, Chuankai Zhang, Chuannan Fan, Haibin Wang, Huali Cai, Rui Xiao, Zhengjie Huang, Qi Luo, miR-411-5p inhibits proliferation and metastasis of breast cancer cell via targeting GRB2, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016. Volume 476. Issue 4. Pages 607-613.
55. Hui Yao, Dong Xia, Zong-lin Li, Lei Ren, Ming-ming Wang, Wang-sheng Chen, Zheng-chuan Hu, Guo-ping Yi, Liang Xu; MiR-382 functions as tumor suppressor and chemosensitizer in colorectal cancer. *Biosci Rep* 30 August 2019. 39(8):BSR20180441
56. Yang ZX, Zhang B., Wei, J. et al. MiR-539 inhibits proliferation and migration of triple-negative breast cancer cells by down-regulating LAMA4 expression. *Cancer Cell Int.* 2018. 18:16

RINGRAZIAMENTI

Vorrei dedicare qualche riga a coloro che hanno contribuito alla realizzazione della mia tesi di laurea

Grazie alle mie relatrici Eva Alessandra e Viaggi Silvia e alla correlatrice Nitti Maria Paola per il sostegno e i consigli che mi hanno dato nel portare avanti questo progetto di ricerca.

Un ringraziamento speciale va alla mia Tutor Morini Martina, una guida pronta a fornirmi strumenti, migliorie, suggerimenti utili ai fini della stesura dell'elaborato che mi ha formato in questi anni di tirocinio sempre presente e disponibile.

Ringrazio i miei genitori Andrea e Antonella e mio fratello Giacomo che da sempre mi sostengono nella realizzazione dei miei progetti, credendo in me e che mi sono sempre stati accanto con l'infinita pazienza che li contraddistingue.

Ringrazio la mia fidanzata Marta per avermi trasmesso la sua immensa forza e il suo coraggio. Grazie per tutto il tempo che mi hai dedicato. Grazie perché ci sei sempre stata insieme alla tua famiglia.

Grazie, infine, ai miei amici che mi hanno sostenuto e per essere stati sempre presenti per aver ascoltato i miei sfoghi e per tutti i momenti di spensieratezza.