

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102009901716440A1

Publication Date

20100924

Applicant

ZOLLO MASSIMO

Title

USO DI MICRORNA-199B-5P IN CAMPO MEDICO E DIAGNOSTICO.

Uso di MicroRNA-199b-5p in campo medico e diagnostico

La presente invenzione concerne l'uso di MicroRNA-199b-5p in campo medico e diagnostico. In particolare la presente invenzione concerne l'impiego di miR199b-5p nella terapia anti tumorale e come marcatore dello stadio istopatologico del tumore e della presenza di metastasi.

I MicroRNAs (miRNAs) sono RNAs a singolo filamento di circa 22 nucleotidi di lunghezza, che costituiscono una nuova classe di geni regolatori [1]. Nei mammiferi, i miRNAs esplicano la loro funzione regolatoria attraverso il legame (in maniera non complementare) alla regione 3' non tradotta (3'UTR) dei loro mRNA targets. Alterazioni nell'espressione dei miRNAs è stata studiata in diversi tipi di tumori , ad esempio: linfoma a cellule B (miR-17) [2,3], linfomi maligni (miR-15a, miR-16-1; che hanno come target BCL2) [4], glioblastomi (miR-21) [5], tumori del colon retto (miR-143, miR-145) [6], tumori del polmone (miR-29) [7], e tumori alla mammella (miR-10b) [8], e tanti altri che sono ancora in studio.

Il medulloblastomas (MBs) è il più frequente tra i tumori maligni pediatrici. Il MBs sembra originare dalle cellule staminali e dai precursori dei neuroni granulari presenti nello strato granulare esterno del cervelletto [9], o da precursori multipotenti presenti nella zona ventricolare del cervelletto [10-12]. L'attuale trattamento di questa neoplasia include la resezione chirurgica seguita dal trattamento

radioterapico e chemioterapico. Tuttavia, anche se questi trattamenti possono migliorare il tasso di sopravvivenza, il MB resta incurabile in circa un terzo dei pazienti. La principale causa di decesso è dovuta alla recidiva del tumore dopo resezione clinica, sulla quale l'attuale approccio terapeutico non ha effetti [13]. Inoltre, questi trattamenti sono molto tossici e comportano danni permanenti [14-16]. Nel medulloblastoma è quindi di fondamentale importanza, trovare nuove terapie, efficaci e poco tossiche.

Le cellule di MB hanno un'importante sotto-classe di cellule con proprietà simili alle cellule staminali, che sono le uniche capaci di iniziare la crescita tumorale [17,18]. Recenti studi, hanno dimostrato che sia i progenitori che le cellule staminali possono rispondere ai segnali del pathway di Sonic-Hedgehog (Shh) e possono quindi essere all'origine del MB [19].

L'attività del pathway di Notch regola i progenitori delle cellule granulari da cui origina il MB, in particolare, il gene *Notch2* è amplificato nel 15% dei MBs [12,20]. L'espressione di *HES1*, il principale gene responsivo a Notch, previene sia la migrazione dei progenitori neurali che l'espressione di geni marcatori neuronali [21]. I topi knockout per il gene *HES1* mostrano una neurogenesi prematura, con up-regolazione dei fattori di trascrizione neuronali bHLH e difetti del tubo neurale [22]; le cellule progenitrici derivanti da questi topi hanno un potenziale di auto-rigenerazione difettivo [23].

L'espressione di *HES1* nel MB è stata associata ad una

prognosi infausta [24]. Inoltre, è stata postulata una interazione con il pathway di Shh durante lo sviluppo dei precursori delle cellule granulari [25], ed interazioni con altri pathways, come quello dei geni polycomb (*BMI-1*) [26].

Alla luce di quanto esposto sopra, risulta pertanto evidente l'esigenza di poter disporre di sempre nuovi metodi terapeutici per la prevenzione e cura dei tumori e di metodi diagnostici per valutare lo stadio istopatologico del tumore e della presenza di metastasi.

Gli autori della presente invenzione hanno ora trovato che l'espressione del miR-199b-5p è diminuita nei pazienti metastatici e hanno postulato che questo processo sia mediato da meccanismi di silenziamento che avvengano durante la carcinogenesi. Gli autori hanno così identificato un nuovo marcatore molecolare per la sotto-classe di pazienti con MB a basso rischio. Infatti, il miR199b-5p inficia la percentuale di cellule staminali CD133+, che in un modello xenograft murino di MB si traduce in una diminuzione della crescita del tumore nel cervelletto. Pertanto, miR199b-5p può essere vantaggiosamente impiegato come terapia anti tumorale oltre che come marcatore dello stadio istopatologico del tumore e della presenza di metastasi.

In uno screening di linee cellulari di MB, il miRNA miR-199b-5p risulta essere un regolatore del pathway di Notch attraverso il putativo target HES1, un fattore di trascrizione. La diminuzione di espressione

di HES1 operata dal MiR-199b-5p regola negativamente il tasso di proliferazione e la crescita ancoraggio dipendente delle cellule di MB. La over-espressione del miR-199b-5p inficia l'espressione di diversi geni implicati nella biologia delle cellule staminali, il potenziale di crescita delle cellule di MB nel cervelletto di topi nudi atimici e in particolare diminuisce la quota di cellule staminali CD133+. Nella nostra analisi su 61 pazienti con MB, l'espressione del miR-199b-5p nei casi non metastatici è significativamente più alta rispetto ai casi metastatici ($P = 0.001$). La correlazione con la sopravvivenza per questi pazienti con alta espressione del miR-199b mostra una migliore sopravvivenza rispetto ai pazienti con bassa espressione. La diminuzione di espressione del miR-199b-5p nei MBs metastatici suggerisce un potenziale meccanismo di silenziamento del microRNA dovuto ad alterazioni genetiche ed epigenetiche. Il trattamento con un agente demetilante 5-aza-deoxycytidine, aumenta l'espressione del miR-199b-5p in un pannello di linee cellulari di MB, supportando l'ipotesi di un meccanismo di regolazione epigenetico. In particolare, due linee cellulari (Med8a and UW228) mostrano una significativa up-regolazione del miR-199b-5p dopo il trattamento. Abbiamo creato, inoltre, un modello xenograft in cervelletti di topo, infettando con un adenovirus, codificante per il miR-199b-5p, cellule di MB ed iniettando tali cellule direttamente nel cervelletto dei topi. L'infezione (confrontata con quella di controllo) dimostra un

chiaro beneficio clinico del miR-199b-5p grazie alla sua influenza negativa sulla crescita cellulare e sulla sottopopolazione di cellule staminali.

Forma pertanto oggetto specifico della presente invenzione una sequenza oligonucleotidica comprendente la o consistente in:
CCAGAGGACACCT**CCACTCCGTCTACCCAG**TGTTTAGACTATCTGTTCAGGACTC
CCAAATTGTACAGTAGTCTGCACATTGGTTAGGCTGGGCTGGGTTAGACCCTCGG
(SEQ ID No: 1) per l'uso in campo medico. In particolare, la sequenza evidenziata è la sequenza **del miR-199b-5p maturo**.

La sequenza sopra descritta può essere veicolata mediante un vettore virale, ad esempio adenovirale, o mediante tecnologia SNALP, tecnologia LNA, o può essere modificata sul gruppo O-2-Metile mediante legame di una molecola di colesterolo tramite un linker C₁₋₇. In particolare, il vettore adenovirale può essere, ad esempio, un vettore AdV5 avente mappa mostrata in figura 15 e 16, detto vettore essendo costituito da 6217bp con un promotore CMV in cui è stato clonato nei siti XhoI/HindIII la sequenza SEQ ID NO:1.

Costituisce ulteriore oggetto della presente invenzione una composizione comprendente o consistente nella sequenza in forma veicolabile come definita sopra come principio attivo in associazione con uno o più eccipienti e/o coadiuvanti farmaceuticamente accettabili.

La presente invenzione concerne inoltre l'uso della sequenza o della composizione come definite sopra per la preparazione di un medicamento per la cura e/o

la prevenzione dei tumori quali ad esempio medulloblastoma, linfoma, glioblastomi, tumori del colon, del polmone, tumori alla mammella.

Costituisce ulteriore oggetto della presente invenzione l'uso della sequenza come definita sopra come marcatore dello stadio istopatologico del tumore e della presenza o meno di metastasi.

La presente invenzione riguarda un metodo diagnostico *in vitro* per la valutazione dello stadio istopatologico del tumore e della presenza o meno di metastasi mediante rilevazione dell'espressione della sequenza come definita sopra in un campione biologico.

Secondo una forma di realizzazione della presente invenzione, il metodo diagnostico prevede la rilevazione mediante PCR Real-time che impiega i seguenti primer di amplificazione:

primer Forward: CGGGAATTCCCAGAGGACACCTCCAC (SEQ ID NO:3)

primer Reverse: CGGCTCGAGCCGAGGGTCTAACCCAG (SEQ ID NO:4)

e una coppia di primer di controllo per la normalizzazione del valore di espressione della sequenza sopra definita. In particolare, i primer di controllo per la normalizzazione dell'espressione della sequenza sono i seguenti:

primer Forward: GAA AAG CCT TGT TTG TGC TTG C (SEQ ID NO: 5)

primer Reverse: GGG CCA TGC TAA TCT TCT CTG T (SEQ ID NO: 6)

Alternativamente il metodo diagnostico

- 7 -

comprendente o consistente nelle seguenti fasi: a) retrotrascrizione del RNA; e b) espressione della sequenza SEQ ID NO:1 mediante saggio taqman che impiega i seguenti primer e sonda:

primer Forward: AGGACACCTCCACTCCGTCTAC (SEQ ID NO:7)

primer reverse: GCCTAACCAATGTGCAGACTACTG (SEQ ID NO:8)

sonda: CAGTGTTTAGACTATCTGTTTCAGGACTCCCAAATTG (SEQ ID NO:9)

Secondo una ulteriore forma di realizzazione della presente invenzione, il metodo diagnostico in vitro è condotto mediante TaqMan PCR real time che impiega i seguenti primer e sonda:

Primer Reverse CCCAGTGTTTAGACTATCTG (SEQ ID NO:10)

primer forward GAGACCCGCGGAAATC (SEQ ID NO:11)

sonda GCTCCCGCACCGCGGGTCTCGA (SEQ ID NO:12)

Il metodo diagnostico secondo la presente invenzione può prevedere ulteriormente la rilevazione dei seguenti geni espressi nelle cellule staminali tumorali scelti tra

CD133, c-myc, Nanog, Oct4, TCFL1, ZIC1, KLF5, HMGA1, HMGB3

In particolare, i geni possono essere rilevati con PCR real time mediante amplificazione di almeno una delle seguenti sequenze:

CD133:

CTATGTGGTACAGCCGCGTGATTTCCCAGAAGATACTTTGAGAAAATTCTTACAG
AAGGCATATGAATCCAA AATTGATTA (SEQ ID NO: 13)

c-myc:

AGGAGGAACAAGAAGATGAGGAAGAAATCGATGTT (SEQ ID NO:14)

Nanog:

- 8 -

GCAAATGTCTTCTGCTGAGATGCCTCACACGGAGACTGTCTCTCCTCTTCCTTCC
TCCATGGATCTGCTTATTCAGGACAGC (SEQ ID NO:15)

Oct4:

ACTGCAGCAGATCAGCCACATCGCCCAGCAGCTTGGGCTCGAGAAGG
ATGTGGTCCGAGTGTGGTTCTGTAACCGGCGCCA (SEQ ID NO:16)

TCFL1:

CCGCGGGACTATTTGCGCGAAGTGAGAAGGCCTCAGGACAGCGCG TTCTTT
(SEQ ID NO:17)

ZIC1:

CAGTTCGCTGCGCAAACACATGAAGGTCCACGAATCCTCCTCGCAGGGCTC
(SEQ ID NO:18)

KLF5:

GCATCCACTACTGCGATTACCCTGGTTGCACAAAAGTTTATACCAAGTCTTCTCA
(SEQ ID NO:19)

HMGA1:

AAAAACAAGGGTGCTGCCAAGACCCGAAAACCACCACAACCTCCAGGAAGG
(SEQ ID NO:20)

HMGB3:

TTTTCCAAGAAGTGCTCTGAGAGGTGGAAGACGATGTCCGGGAAAGAGAAA
(SEQ ID NO:21);

impiegando le seguenti coppie di primer di
amplificazione:

CD133:

Primer Forward: CTATGTGGTACAGCCGCGTG (SEQ ID NO:22)

Primer Reverse: TAATCAATTTTGGATTCATATGCCTTC (SEQ ID
NO:23)

c-myc

primer Forward: ATGAGGAGACACCGCCAC (SEQ ID NO:24)

primer Reverse: AACATCGATTTCTTCCTCATCTTCTT (SEQ ID
NO:25)

Nanog:

primer Forward: GCAAATGTCTTCTGCTGAGATGC (SEQ ID NO:26)

primer Reverse: GCTGTCCTGAATAAGCAGATCCAT (SEQ ID NO:27)

Oct4:

primer Forward: ACTGCAGCAGATCAGCCACA (SEQ ID NO:28)

primer Reverse: TGGCGCCGGTTACAGAAC (SEQ ID NO:29)

TCFL1:

primer Forward: CCGCGGGACTATTTTCGC (SEQ ID NO:30)

primer Reverse: AAAGAACGCGCTGTCCTGAG (SEQ ID NO:31)

ZIC1:

primer Forward: CAGTTCGCTGCGCAAACA (SEQ ID NO:32)

primer Reverse: GAGCCCTGCGAGGAGGAT (SEQ ID NO:33)

KLF5:

primer Forward: GCATCCACTACTGCGATTACCC (SEQ ID NO:34)

primer Reverse: TGAGAAGACTTGGTATAAACTTTTGTGC (SEQ ID NO:35)

HMGA1:

primer Forward: AAAAACAAGGGTGCTGCCAA (SEQ ID NO:36)

primer Reverse: CCTTCCTGGAGTTGTGGTGGT (SEQ ID NO:37)

HMGB3:

primer Forward: TTTTCCAAGAAGTGCTCTGAGAGG (SEQ ID NO:38)

primer Reverse: TTTCTCTTTCCCGGACATCG (SEQ ID NO:39)

ed impiegando le seguenti coppie di primer per la normalizzazione dell'espressione delle sequenze geniche:

primer forward: CGT GCT GCT GAC CGA GG (SEQ ID NO:79)

primer reverse: GAA GGT CTC AAA CAT GAT CTG GGT (SEQ ID NO:80)

Alternativamente, detti uno o più geni possono essere rilevati mediante real time TaqMan per

- 10 -

amplificazione di almeno una delle seguenti sequenze:

cd133

TCCACAGAAATTTACCTACATT

GGAAGAGTATGATTCATACTGGTGGCTGGGTGGCCTGGTCATCTGCTCTCTGCTG

ACCC (SEQ ID NO:40)

c myc

GCTGGATTTTTTTCGGGTAGTGGAACACCAGCAGCCT

CCCGCGACGATGCCCCCTCAACGTTAGCTTCACCAACAGGAACTA (SEQ ID NO:41)

nanog:

CCGAAGAATAGCAATGGTGTGACGCAG

AAGGCCTCAGCACCTACCTACCCCAGCCTTTACTCTTCCTACCACCAGGGATG

(SEQ ID NO:42)

oct 4:

AACCCGGAGGAGGTAGTCCTTTGTTACATGCATGAGTCAGTGAACAGGGAATGGG

TGAATGACATTTGTGGGTAGGTTATT (SEQ ID NO:43)

tcf11:

CCAAGGAAGAGAACGTTGACATAGAAGGCTCTTTGTGTTTTTCCTTGTCTTTTGT

CCTCAGACTTGATCCTGCTCCCTCGG (SEQ ID NO:44)

zic 1:

CGCGCTCCGAGAATTTAAAGATCCACAAAAGGACGCACACAGGGAGAAGCCCTTC

AAGTGCGAGTTTGAGGGCTGTGACC (SEQ ID NO:45)

KLF5:

TTTAACCCACCTCCATCCTATGCTGCTACAATTGCTTCTAAACTGGCAATTCAC

AATCCAAATTTACCCACCACCCTGCC (SEQ ID NO:46)

HMGA1:

CCCCAGGCAGACCTTATATGAGACATGGGAGTCCCACCGTATTGTCCAGGCTGGT

CTCGAACTCCTGACCTCAAGCA (SEQ ID NO:47)

HMGB3:

- 11 -

CGCTATGATCGGGAAATGAAGGATTATGGACCAGCTAAGGGAGGCAAGAAGAAGA
AGGATCCTAATGCTCCCAAAGGCCA (SEQ ID NO:48);

impiegando i seguenti primer e sonde di
amplificazione:

cd133

primer Forward: TCCACAGAAATTTACCTACATTGGAA (SEQ ID
NO:49)

primer Reverse: GGGTCAGCAGAGAGCAGATGA (SEQ ID NO:50)

sonda: AGTATGATTCATACTGGTGGCTGGGTGGC (SEQ ID NO:51)

c myc:

primer forward :GCTGGATTTTTTTCGGGTAGTG (SEQ ID NO:52)

primer reverse: TAGTTCCTGTTGGTGAAGCTAACG (SEQ ID NO:53)

sonda CAGCAGCCTCCCGCGACG (SEQ ID NO:54)

nanog:

primer forward: CCGAAGAATAGCAATGGTGTGA (SEQ ID NO:55)

primer reverse: GCATCCCTGGTGGTAGGAAGA (SEQ ID NO:56)

sonda: CAGCACCTACCTACCCAGCCTTTA (SEQ ID NO:57)

oct 4:

primer forward: AACCCGGAGGAGGTAGTCCTT (SEQ ID NO:58)

primer reverse: AATAACCTACCCACAAATGTCATTCA (SEQ ID
NO:59)

sonda: CATGCATGAGTCAGTGAACAGGGAA (SEQ ID NO:60)

tcfl1:

primer forward: CCAAGGAAGAGAACGTTGACATAG (SEQ ID NO:61)

primer reverse: CCGAGGGAGCAGGATCAAG (SEQ ID NO:62)

sonda: AGGCTCTTTGTGTTTTTCCTTGTCTTTTGTCC (SEQ ID NO:63)

zic 1:

primer forward: CGCGCTCCGAGAATTTAAAG (SEQ ID NO:64)

primer reverse: CGGTCACAGCCCTCAAATC (SEQ ID NO:65)

sonda: TCCACAAAAGGACGCACACAGGG (SEQ ID NO:66)

KLF5:

Primer forward: TTTAACCCACCTCCATCCTATG (SEQ ID NO:67)

Primer reverse: GGCAGGGTGGTGGGTAAATT (SEQ ID NO:68)

Sonda: TGCTTCTAAACTGGCAATTCACAATC (SEQ ID NO:69)

HMGA1:

Primer forward: CCCCAGGCAGACCTTATATGAG (SEQ ID NO:70)

Primer reverse: TGCTTGAGGTCAGGAGTTCGA (SEQ ID NO:71)

Sonda: CATGGGAGTCCCACCGTATTGTCCA (SEQ ID NO:72)

HMGB3:

primer forward: CGCTATGATCGGGAAATGAAG (SEQ ID NO:73)

primer reverse: TGGCCTTTTGGGAGCATTAG (SEQ ID NO:74)

sonda: ATTATGGACCAGCTAAGGGAGGCAAG (SEQ ID NO:75)

ed impiegando le seguenti coppia di primer e sonda per la normalizzazione dell'espressione delle sequenze geniche:

primer Forward: GCCAACCGCGAGAAGATG (SEQ ID NO:81)

primer Reverse: ACAGCCTGGATAGCAACGTACA (SEQ ID NO:82)

sonda: CCCAATCATGTTTGAGACCTTCAAC (SEQ ID NO:83)

Costituisce ulteriore oggetto della presente invenzione un kit diagnostico *in vitro* per la valutazione dello stadio istopatologico del tumore e della presenza di metastasi mediante rilevazione dell'espressione della sequenza SEQ ID NO:1 in un campione biologico per PCR Real-time comprendente i o consistente nei seguenti primer di amplificazione:

primer Forward: CGGGAATTCCCAGAGGACACCTCCAC (SEQ ID NO:3)

primer Reverse: CGGCTCGAGCCGAGGGTCTAACCCAG (SEQ ID NO:4)

e una coppia di primer di controllo per la

normalizzazione del valore di espressione della sequenza SEQ ID NO:1 quali, ad esempio, i seguenti:

primer Forward: GAA AAG CCT TGT TTG TGC TTG C (SEQ ID NO: 5)

primer Reverse: GGG CCA TGC TAA TCT TCT CTG T (SEQ ID NO: 6)

Alternativamente, la presente invenzione concerne un Kit diagnostico *in vitro* per la valutazione dello stadio istopatologico del tumore e della presenza di metastasi mediante rilevazione dell'espressione della sequenza SEQ ID NO:1 in un campione biologico mediante saggio taqman comprendente i o consistente nei seguenti primer e sonda

primer Forward: AGGACACCTCCACTCCGTCTAC (SEQ ID NO:7)

primer reverse: GCCTAACCAATGTGCAGACTACTG (SEQ ID NO:8)

sonda: CAGTGTTTAGACTATCTGTTTCAGGACTCCCAAATTG (SEQ ID NO:9)

Secondo una ulteriore forma di realizzazione della presente invenzione, il Kit diagnostico *in vitro* per la valutazione dello stadio istopatologico del tumore e della presenza di metastasi prevede la rilevazione dell'espressione della sequenza SEQ ID NO:1 in un campione biologico mediante TaqMan PCR real time comprendente i o consistente nei seguenti primer e sonda:

Primer Reverse CCCAGTGTTTAGACTATCTG (SEQ ID NO:10)

primer forward GAGACCCGCGGAAATC (SEQ ID NO:11)

sonda GCTCCCGCACCGCGGGTCTCGA (SEQ ID NO:12)

Alternativamente i kit sopra descritti possono comprendere ulteriormente tutte le coppie di primer di

amplificazione per la rilevazione dei geni marcatori di cellule staminali tumorali scelti tra CD133, c-myc, Nanog, Oct4, TCFL1, ZIC1, KLF5, HMGA1, HMGB3 mediante PCR real Time assieme ad una coppia di primer per la normalizzazione dell'espressione delle sequenze geniche; dette coppie di primer di amplificazione essendo le seguenti:

CD133:

Primer Forward: CTATGTGGTACAGCCGCGTG (SEQ ID NO:22)

Primer Reverse: TAATCAATTTTGGATTCATATGCCTTC (SEQ ID NO:23)

c-myc

primer Forward: ATGAGGAGACACCGCCAC (SEQ ID NO:24)

primer Reverse: AACATCGATTCTTCCTCATCTTCTT (SEQ ID NO:25)

Nanog:

primer Forward: GCAAATGTCTTCTGCTGAGATGC (SEQ ID NO:26)

primer Reverse: GCTGTCCTGAATAAGCAGATCCAT (SEQ ID NO:27)

Oct4:

primer Forward: ACTGCAGCAGATCAGCCACA (SEQ ID NO:28)

primer Reverse: TGGCGCCGGTTACAGAAC (SEQ ID NO:29)

TCFL1:

primer Forward: CCGCGGGACTATTTTCGC (SEQ ID NO:30)

primer Reverse: AAAGAACGCGCTGTCCTGAG (SEQ ID NO:31)

ZIC1:

primer Forward: CAGTTCGCTGCGCAAACA (SEQ ID NO:32)

primer Reverse: GAGCCCTGCGAGGAGGAT (SEQ ID NO:33)

KLF5:

primer Forward: GCATCCACTACTGCGATTACCC (SEQ ID NO:34)

primer Reverse: TGAGAAGACTTGGTATAAACTTTTGTGC (SEQ ID

NO:35)

HMGA1:

primer Forward: AAAAACAAGGGTGCTGCCAA (SEQ ID NO:36)

primer Reverse: CCTTCCTGGAGTTGTGGTGGT (SEQ ID NO:37)

HMGB3:

primer Forward: TTTTCCAAGAAGTGCTCTGAGAGG (SEQ ID NO:38)

primer Reverse: TTTCTCTTTCCCGGACATCG (SEQ ID NO:39)

detta coppia di primer per la normalizzazione dell'espressione delle sequenze geniche essendo la seguente:

primer forward: CGT GCT GCT GAC CGA GG (SEQ ID NO:79)

primer reverse: GAA GGT CTC AAA CAT GAT CTG GGT (SEQ ID NO:80)

La presente invenzione concerne inoltre uno dei kit sopra descritti che comprende ulteriormente una o più coppie di primer e reattive sonde per la rilevazione di uno o più geni di cellule staminali tumorali scelti tra CD133, c-myc, Nanog, Oct4, TCFL1, ZIC1, KLF5, HMGA1, HMGB3 mediante real Time TaqMan assieme ad una coppia di primer e sonda per la normalizzazione dell'espressione delle sequenze geniche; dette coppie di primer e relative sonde di amplificazione essendo le seguenti:

cd133

primer Forward: TCCACAGAAATTTACCTACATTGGAA (SEQ ID NO:49)

primer Reverse: GGGTCAGCAGAGAGCAGATGA (SEQ ID NO:50)

sonda: AGTATGATTTCATACTGGTGGCTGGGTGGC (SEQ ID NO:51)

c myc:

primer forward :GCTGGATTTTTTTTCGGGTAGTG (SEQ ID NO:52)

- 16 -

primer reverse: TAGTTCCTGTTGGTGAAGCTAACG (SEQ ID NO:53)

sonda CAGCAGCCTCCCGCGACG (SEQ ID NO:54)

nanog:

primer forward: CCGAAGAATAGCAATGGTGTGA (SEQ ID NO:55)

primer reverse: GCATCCCTGGTGGTAGGAAGA (SEQ ID NO:56)

sonda: CAGCACCTACCTACCCCAGCCTTTA (SEQ ID NO:57)

oct 4:

primer forward: AACCCGGAGGAGGTAGTCCTT (SEQ ID NO:58)

primer reverse: AATAACCTACCCACAAATGTCATTCA (SEQ ID NO:59)

sonda: CATGCATGAGTCAGTGAACAGGGAA (SEQ ID NO:60)

tcfl1:

primer forward: CCAAGGAAGAGAACGTTGACATAG (SEQ ID NO:61)

primer reverse: CCGAGGGAGCAGGATCAAG (SEQ ID NO:62)

sonda: AGGCTCTTTGTGTTTTTCCTTGTCTTTTGTCC (SEQ ID NO:63)

zic 1:

primer forward: CGCGCTCCGAGAATTTAAAG (SEQ ID NO:64)

primer reverse: CGGTCACAGCCCTCAAACCTC (SEQ ID NO:65)

sonda: TCCACAAAAGGACGCACACAGGG (SEQ ID NO:66)

KLF5:

Primer forward: TTAAACCCACCTCCATCCTATG (SEQ ID NO:67)

Primer reverse: GGCAGGGTGGTGGGTAAATT (SEQ ID NO:68)

Sonda: TGCTTCTAAACTGGCAATTCACAATC (SEQ ID NO:69)

HMGA1:

Primer forward: CCCCAGGCAGACCTTATATGAG (SEQ ID NO:70)

Primer reverse: TGCTTGAGGTCAGGAGTTCGA (SEQ ID NO:71)

Sonda: CATGGGAGTCCCACCGTATTGTCCA (SEQ ID NO:72)

HMGB3:

primer forward: CGCTATGATCGGGAAATGAAG (SEQ ID NO:73)

primer reverse: TGGCCTTTTGGGAGCATTAG (SEQ ID NO:74)

sonda: ATTATGGACCAGCTAAGGGAGGCAAG (SEQ ID NO:75)

dette coppia di primer e sonda per la normalizzazione dell'espressione delle sequenze geniche essendo le seguenti:

primer Forward: GCCAACCGCGAGAAGATG (SEQ ID NO:81)

primer Reverse: ACAGCCTGGATAGCAACGTACA (SEQ ID NO:82)

sonda: CCCAATCATGTTTGAGACCTTCAAC (SEQ ID NO:83)

La presente invenzione verrà ora descritta a titolo illustrativo, ma non limitativo, secondo sue forme preferite di realizzazione, con particolare riferimento alle figure dei disegni allegati in cui:

Figura 1 mostra la funzione di miR199b-5b sulla proliferazione e la differenziazione delle cellule Daoy di MB in vitro: A) L'analisi FACS con iodio propidio mostra per il clone stabile di 199bSC1 un decremento nella percentuale di cellule in fase S ed incremento nelle fasi G0-G1. L'assenza di segnali della spalla con il picco rosso in G0-G1 nei cloni 199bSC1 e 199bMC1 esclude processi apoptotici. B) Il dosaggio di proliferazione da 3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-5-3-carboxymethoxyphenyl-2-4-sulfophenyl-2H-tetrazolium salt (MTS), mostra una diminuita proliferazione dei cloni stabili 199bSC1 (triangoli rossi) e del clone 199bMC1 (croce verde), comparato col clone stabile con solo il vettore vuoto (diamante blu). Questo effetto di miR-199b-5p overespressione è ridotto con la trasfezione 2-OM (quadrati di colore rosa). I dati indicati sono medie $\pm$ SD da due esperimenti indipendenti, ciascuno effettuato in triplice copia. C) Espressione di mRNA dei marker di differenziazione (ad

esempio MASH1, MATH3 e NEUROGENIN 2) e di proliferazione (ad esempio, c-myc, CYCLIN D1) su miR-199b-5p overespresso, rivelato da PCR real-time, confrontando i cloni stabili 199bSC1 e 199bMC1 con il clone avente il vettore vuoto. D) Il clone stabile 199bSC1 per miR-199b-5p mostra ridotta formazione di colonie nel test col soft agar. Il plot mostra colonie ottenute con la media $\pm$ SD di tre esperimenti indipendenti, ciascuno effettuata in triplice copia. E) Western blot utilizzando anticorpi anti-c-myc e anti-cyclin D1 dimostrano che queste due proteine sono down regolate nel clone 199bSC1; si veda anche l'analisi densitometrica nel pannello a destra. F) Per quanto riguarda E, mostra le proteine GABRA6 e MATH3 up-regolate dopo l'espressione di miR-199b, suggerendo l'induzione di differenziazione. Anticorpi Anti-Laminin- β sono stati utilizzati per normalizzare nucleare l'espressione delle proteine nucleari c-myc e cyclin D1. Gli anticorpi Anti- β -Actin sono utilizzati per normalizzare l'espressione delle proteine citoplasmiche GABRA6 e MATH3.

Figura 2 mostra che l'over-espressione di miR-199b-5p diminuisce il compartimento CD133+ delle cellule Daoy: A-F) L'analisi FACS dei cloni stabili 199bSC1 (D) e 199bMC1 (F) hanno mostrato una diminuzione della percentuale di cellule positive per i marcatori di cellule staminali CD133 (B), A, C ed E sono controlli negativi (nessun anticorpo).

Figura 3 mostra gli effetti dell'over-espressione di miR-199b-5p rilevati con la trasfezione di HES1: A)

Western Blot ed analisi densitometrica dimostrano che l'espressione di HES1 è revertita dall'overespressione di cDNA di HES1 nel clone stabile 199bSC1 ripristina l'espressione cyclin D1. B) Il saggio di proliferazione col 3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-5-3-carboxymethoxyphenyl-2-4-sulfophenyl-2H-tetrazolium salt (MTS) mostra un aumento di proliferazione del clone stabile 199bSC1 con l'espressione di HES1 (quadrantini blu scuro), rispetto al clone stabile 199bSC1 (diamanti blu). I dati indicati sono medie $\pm$ SD da due esperimenti indipendenti, ciascuno effettuata in triplice copia. C) L'espressione di mRNA dei marcatori di differenziazione (ad esempio MASH1, MATH3 e NEUROGENIN 2) e di proliferazione (ad esempio, c-myc, CYCLIN D1) su cellule trasfettate con HES1 nel clone stabile 199bSC1, a confronto con le cellule wild-type, come rivelato da PCR real-time. L'espressione di GABRA6 e MAP2 è down-regolata nell'esperimento con cellule trasfettate con HES1. D) L'analisi FACS del clone stabile 199bSC1 esprime HES1 mostra un aumento della frazione di cellule in fase S, e una diminuzione in G1, rispetto al clone stabile 199bSC1. E-H) L'effetto dell'espressione di miR-199b-5p su SP di cellule Daoy è invertito dalla ri-espressione di HES1. Il clone stabile 199bSC1 è stato transfettato con cDNA HES1 e un plasmide codificante GFP, quindi trattato dopo 48 ore con Hoechst e verapamil (E-F) o solo Hoechst (G-H) e analizzati con FACS. Le cellule GFP positive (P5 gate), pannello E e G, sono state analizzate per la presenza di SP (F-H, P6). Le cellule trasfettate GFP negative

(P3 gate), non sono stati analizzati.

Figura 4 mostra la diminuzione di cancerogenicità su cellule Daoy esprimenti miR-199b-5p: A) L'esperimento di xenotrapianto alla nona settimana, in seguito ad iniezione s.c. di cinque topi con cellule Daoy controllo (lato CTR) e su cellule Daoy overesprimenti miR-199b-5p (lato 199b). Con le cellule CTR, i tumori sono rilevati macroscopicamente in 5 / 5 topi, con le cellule over-esprimenti, in 3 / 5 topi. Il volume totale del tumore differenzia tra il lato iniettato col CTR e il 199b dopo nove settimane ed è statisticamente significativo, come indicato (media $\pm$ SD). B) L'emissione di fotoni del topo#4, dopo nove settimane dalla crescita tumorale. Il lato 199b (199bLuc-1) ha avuto un'emissione costantemente più basso di fotone rispetto al lato controllo (Ctrl-Luc-4). E' mostrato anche il confronto delle dimensioni del tumore. C) Quando l'emissione di fotoni (vedi B) è stato convertito in numero di cellule, uno dei cinque topi non ha mostrato differenze significative (media $\pm$ SD) (two tailed unpaired *t* test). D) L'emissione di fotoni di 3 topi iniettati nel quarto ventricolo con rispettivamente: 199bLuc-1, Ctrl-Luc-4 infettati con Adv5, e Ctrl-Luc-4 infettato con miR-199b-5p Adv5. E) Cervello intero dell'animale e il sito di iniezione (freccia bianca). Hematoxylin / eosin staining del cervelletto; freccia nera, sito di iniziazione della tumorigenesi. F) BLI del topo iniettato come per D, dopo un mese dal tumore. Le differenze tra i gruppi sono statisticamente significativi. G) BLI di due topi

selezionati mostrano lo sviluppo di tumore con Ctrl-luc4-AdV5 Mock-#7, e nel corso del tempo la riduzione con Ctrl-luc4-AdV5-199b#3 (0-8 settimane). H) Hematoxylin/eosin staining di cervelletto da animali AdV5-Mock#2 e AdV5-199b#3 a 10 settimane dopo l'iniezione ortotopica, mostrando le cellule tumorali circostanti lo strato granulare esterno e ventricolo IV (White Star). Nel blu, colorazione col DAPY, insieme con la detezione di GFP. Ingrandimento come indicato.

Figura 5 mostra immagini molecolari ad alta risoluzione di cellule di MB xenotrapiantate iniettate nel cervelletto: Le immagini PET-CT di topi AdV5 Mock-# 7 (A) e AdV5-199b # 5 (B), a 12 settimane dall'intervento chirurgico e dall'iniezione, con volume di rendering 3D e simultanea visualizzazione delle zone di captazione FLT (blu-verde, frecce bianche). E' evidente nel topo AdV5 Mock-# un più ampio difetto osseo nella parte occipito-parietale del cranio. Sotto: tabella delle misurazioni (cm³) della massa tumorale ottenuta con l'acquisizione del PET-CT (come descritto in Informazioni di supporto).

Figura 6 mostra i livelli di espressione di miR199b nel cervelletto umano e nei tumori, e la correlazione con la prognosi: A) Box-plot dei livelli di espressione di miR-199b-5p in cervelli umani sani in due fasce di età. MiR-199b-5p mostra un'espressione più alta in espianti da controlli giovani (Mann-Whitney test, $P = 0,006$). B) Nei casi esprimenti MiR-199b-5p alto sono per la maggior parte dei casi M0 $P = 0,001$ (Pearson Chi-Square test). C) Le stime di sopravvivenza

Kaplan-Meier confrontano i pazienti con bassi livelli rispetto a quelli con altro livello (rispetto alla media) di Mir-199b-5p (dati disponibili dei 45 pazienti con follow-up). D) L'espressione di Mir-199b-5p da PCR real-time in un gruppo di cinque linee cellulari MB non trattati o trattati con 5-Aza-C (DAC-/ +), la demetilazione induce la trascrizione di mir-199b-5p in due linee cellulari: Med8a e UW228. E) L'interazione tra Mir-199b-5p e il pathway di Notch. I pazienti M0 e M+ mostrano diversi livelli di espressione di mir-199b-5p, che potrebbe essere guidato da un meccanismo epigenetico. Lato sinistro: In condizioni di indotta espressione di mir-199b-5p (1), i livelli di HES1 diminuiscono, rilevando l'inibizione sul fattore neurogenico bHLHs (2). Questo, a sua volta, promuove un programma neurogenico e una diminuzione della proliferazione, SP e cellule CD133+ (3). Lato destro: In condizioni di bassa espressione di mir-199b-5p, i livelli di HES1 sono più elevati (1), reprimendo i geni pro-neurali bHLH, con un conseguente aumento della proliferazione, SP ed un allargamento del comparto CD133+ (4) .

Figura 7 mostra l'associazione dell'espressione del miR199b-5p con la sopravvivenza nei pazienti con MB. Le stime di sopravvivenza Kaplan-Meier confrontano i pazienti con bassi livelli rispetto a quelli con altro ed intermedio livello (rispetto ai percentili a 33° e 66°) del Mir-199b-5p (dati disponibili per follow-up di 90 pazienti su 108).

Figura 8 mostra l'associazione dell'espressione

del miR199b-5p con la sopravvivenza nei pazienti con MB: Le stime di sopravvivenza Kaplan-Meier confrontano i pazienti con bassi livelli rispetto a quelli con altro livello (rispetto ai percentili a 33° e 66°) del Mir-199b-5p (dati disponibili per follow-up di 90 pazienti su 108).

Figura 9 mostra: **A)** Western blots rappresentativi di trasfezioni transienti di cellule HEK293 che esprimono i costrutti per il miR-199b-5p e miR-199a. L'overespressione del MiR-199b-5p abbassa i livelli endogeni della proteina HES1; in contrasto, miR-199a induce un aumento dei livelli di HES1 dopo 48h di trasfezione. A destra: Quantizzazione attraverso analisi densitometriche. **B)** Western blot rappresentativo di trasfezione in transiente di cellule D283 che esprimono il costrutto per il miR-199b-5p e tramite l'uso di un vettore vuoto. Ancora, l'overespressione del miR-199b-5p abbassa i livelli endogeni della proteina HES1. In basso una quantizzazione attraverso analisi densitometriche. **C)** Cellule D283 e SH-SY5Y esprimono livelli simili del miR-199b-5p e miR-124a, quest'ultimo preferenzialmente espresso nel sistema nervoso centrale. In contrasto, le cellule D283Med mostrano un abbassamento considerevole dei livelli del miR-199b-5p. I dati riportati rappresentano la deviazione standard ($\pm$ SD) di due esperimenti indipendenti, ognuno dei quali eseguito in triplicato. **D)** Profili di espressione rappresentativi del **miR-199b-5p** su di un pannello di tessuti umani (Ambion); il miR-199b-5p è espresso a gradi differenti,

con un espressione relativamente alta nel duodeno, nei linfonodi, nei polmoni, nei muscoli scheletrici, nel ventricolo destro (la più alta espressione), nel rene, in tutto il cuore e tiroide.

Il MiR-199b-5p agisce sulla 3'UTR del suo putativo gene target, HES1. **E-F)** Attività luciferasica di un vettore reporter contenente la 3'UTR wild-type di HES1 and la 3'UTR di HES1 mutata nel sito di legame del miR-199b, co-transfettate o no con un vettore di espressione per il miR-199b-5p. L'espressione della luciferasi che deriva dall'attività della 3'UTR wild-type è ridotta del 50% con l'espressione del miR-199b-5p, mentre 2'-O-methyl-oligoribonucleotide (2-OM; 400 nM) blocca tale effetto. Non si riscontrano effetti con la presenza del miR-199b-5p insieme con la 3'UTR di HES1 mutata nel sito di legame. È indicato un esperimento rappresentativo dove i dati sono mostrati $\pm$ SD da tre diversi replicati in linee cellulari di HEK293 e Daoy, rispettivamente. **G-I)** Pre-miR-199 è stato clonato e trasfettato in cellule Daoy, e tre dei cloni stabili sono stati analizzati per l'espressione di HES1 tramite qRT PCR e Western blotting. Si ritrova un significativo abbassamento dei livelli della proteina HES1, come dimostrato usando un anticorpo policlonale anti-HES1; l'abbassamento è stato anche rilevato attraverso analisi densitometriche. (G; pannello a destra) **H)** Un 2'-O-methyl-oligoribonucleotide (2-OM) diretto contro il miR-199b-5p è stato trasfettato nel clone stabile 199bSC1, un Western blot rappresentativo ed un'analisi densitometrica quantitativa mostrano la ristabilita

espressione di HES1. I dati rappresentati sono $\pm$ SD di due esperimenti indipendenti, ognuno dei quali ripetuto in triplicato.

Figura 10 mostra l'espressione del mmu-miR-199b in cervelletti di embrioni di topo e regolazione di altri potenziali target del miR-199b-5p umano: **A)** Espressione in situ in situ dell'mRNA del mmu-miR-199b è riscontrabile a E14.5 e nel cervelletto di topi appena nati (p0). La colorazione risulta diffusa, in tutte le aree del cervelletto; espressione però decresce da E14.5 a p0. Il Mmu-miR-124a (un miRNAs specifico del cervello) è stato usato come controllo. A sinistra:ingrandimento, 50X; A destra: ingrandimento, 200X. **B)** Quantizzazione dell'abbassamento dell'espressione del mmu-miR-199b durante lo sviluppo del topo e il differenziamento del cervelletto. I livelli di espressione del miR-199b-5p maturo sono mostrati rispetto ai livelli di let-7A, con i dati mostrati come $\pm$ SD di due esperimenti indipendenti, ognuno di essi ripetuto in triplicato. **C)** Western blot rappresentativo che mostra i livelli proteici di GSK3- β ..che è predetto come target, in un clone stabile con alta espressione del miR-199b-5p. I livelli di GSK3- β non vengono down-regolati, ed invece si osservano dei piccoli incrementi, come è chiaro dalla quantizzazione tramite analisi desiometriche mostrata nel pannello di destra, dove i dati sono mostrati come $\pm$ SD di due esperimenti indipendenti, ognuno dei quali ripetuto in triplicato **D)** E' stato predetto che il MiR-199b-5p lega altre UTRs (vedi tabella supplementare 3). Quando

la overespressione del miR-199b-5p è stata esamata nella linea Daoy cells per la down-regolazione della traduzione del gene reporter, nessuna 3'UTR sembra essere inficiata.. **E)** Saggio di motilità cellulare in cui si compara la linea cellulare di Daoy 199bSC1 con Daoy che esprimono un vettore vuoto CTR (controllo) usando il sistema Boyden chamber (0.5% FBS come chemioattrattore). Le cellule con maggiore motilità sono state fissate e colorate con ematossilina e successivamente contate al microscopio. I dati mostrati sono $\pm$ SD di due esperimenti indipendenti ripetuti in triplicato, e non indicano una differenza tra il controllo (CTR) e la linea cellulare 199bSC1. **F)** Saggio di proliferazione (MTS) di cellule D283MED e ONS76 over-esprimenti il miR-199b-5p dopo trasfezioni transienti, come indicato. Le cellule D283MED trasfettate con 199b-5p (diamanti blu) mostrano una apprezzabile riduzione nella proliferazione cellulare, se comparata con una trasfezione controllo vettore vuoto (triangoli verdi). Le cellule ONS76 mostrano un più alto tasso di proliferazione ciò nonostante risulta comunque influenzato dell'espressione del 199b-5p trasfettato (confronto tra le barre arancione della trasfezione con il vettore vuoto e i quadrati viola). I dati mostrati sono $\pm$ SD di due esperimenti differenti ed indipendenti, ognuno di questi ripetuto in triplicato. **G)** Silenziamento dell'espressione endogena del miR-199b-5p attraverso la trasfezione del 2-O-methyl oligoribonucleotide antisense (2-OM-a) porta un aumento della proliferazione in cellule Daoy, probabilmente

abbassando il controllo del miR-199b-5p endogeno sulla 3'UTR di HES1. I dati mostrati sono $\pm$ SD di due esperimenti indipendenti ed ognuno di questi ripetuto in triplicato.

Figura 11 mostra l'analisi al FACS del ruolo del miR-199b-5p sulla side population in cellule Daoy: **A, C, E)** Abbassamento nella SP nel clone stabile di Daoy 199bSC1, come determinato tramite colorazione con Hoechst 33342. **B, D, F)** Aggiunta di verapamil per forzare il colorante ad entrare solo nelle cellule della SP. Le cellule Daoy mostrano un 5.2% della frazione di cellule della SP, mentre il clone stabile 199bSC1 e i cloni 199bMC1 che overesprimono il miR-199b-5p non mostrano significativi livelli di cellule della SP (0.2%, 0.4%, rispettivamente).

Figura 12 mostra la creazione di cloni stabili bioluminescenti nella linea Daoy che overesprimono il miR-199b-5p per studi *in-vivo*: Il clone stabile di Daoy con vettore vuoto (Ctl) ed il clone stabile di Daoy che overesprime il miR-199b-5p (199b) sono stati trasfettati con un vettore che esprime la luciferasi (Luc), generando, rispettivamente, il clone Ctl-Luc#4, e i cloni 199bLuc-1 e 199b-Luc-3. Questi sono stati esaminati per l'espressione della bioluminescenza una volta incubati con il substrato dell'enzima, la luciferina. **A)** Emissione di luce di diluizioni seriali di cellule indicate in una microplate. Il segnale di bioluminescenza è stato acquisito tramite l'IVIS 200 Imaging System (Xenogen Corp. Alameda, CA). **B)** Correlazione tra il numero di cellule e fotoni emessi.

I cloni 199b-Luc1 e Ctl-Luc#4 sono stati usati per studi *in-vivo*, i dati mostrati sono $\pm$ SD di due esperimenti indipendenti **C)** Dati rappresentativi dell'espressione del miR-199b-5p nei cloni luciferasi positivi, relativi ai cloni luciferasici con vettore vuoto. **D)** Analisi di immunoblot rappresentative mostrano l'abbassamento dell'espressione di HES1 in cloni 199b-Luc, comparati al clone vettore vuoto. **E, F)** Colorazione con ematossilina ed eosina di xenografts derivati dal topo #4: il controllo di iniezione mostra che lo xenograft infiltra il tessuto muscolare, mentre l'iniezione del 199b non mostra infiltrazione. **G, H)** Nestin è un marcatore dei neuroblasti, e la sua espressione correla con uno stato differenziativo: lo xenograft del topo #4 iniettato con 199b mostra un abbassamento della positività al marcatore Nestin. La colorazione per Nestin è stata ottenuta attraverso esperimenti di immunoistochimica con l'utilizzo di un anticorpo policlonale (Abcam). Ingrandimento, 100X. **I)** Livelli rappresentativi di espressione genica del transgene del miR-199b-5p in espianti di tumore del topo #5. L'overespressione del miR-199b-5p viene persa. **L, M, N)** Immunoistochimica con l'utilizzo dell'anticorpo anti-HES1, anti-KI67, anti-Gabra6, anti-Nestin, anti-Math3 e controcolorazione con ematossilina di xenografts di cervelletti di topo iniettati con Adv5-Mock e Adv5-199b. Significativa espressione delle proteine HES1, Ki67, Nestin e Math3 si riscontra nei tessuti tumorali dei cervelletti Adv5-Mock, mentre una molto bassa espressione di tali

proteine ritrova (HES1, Ki67 Nestin e Math3) si ritrova nelle cellule tumorali dei cervelletti AdV5-199b. Differenze di espressione di Gabra6 sono a mala pena osservabili nei tessuti tumorali tra cervelletti di topi AdV5-Mock e AdV5-199b. Sinistra: ingrandimento, 25X; Destra: ingrandimento, 100X.

Figura 13 mostra che l'overespressione del miR199b endogeno dopo trattamento con DAPT induce down-regolazione di geni coinvolti nella biologia delle cellule embrionali staminali e nelle cellule staminali cancerose nella linea cellulare Daoy: A) Dati rappresentativi di esperimenti su linee cellulari di Daoy trattate con DAPT(6 h, 12 h, 24 h) coltivate con mezzo supplementato e che viene rimpiazzato ogni 4h, ed il fold di espressione del miR199b è stato determinato usando un'analisi di real time, relativamente al tempo 0. B) Western blot rappresentativo mostra la down-regolazione di HES1 dopo 12h di induzione del DAPT in linee cellulari Daoy. C) Livelli relativi di espressione genica di CD133, c-Myc Oct4, KLF5, Nanog, TCF7L1, HMGA1, HMGB3, ZIC1, MYBL2, TEAD4, ILF3 nella linea cellulare Daoy con e senza trattamento con il DAPT per 12h. D) Livelli relativi di espressione genica di PDGFR-A, PDGFR-B e SPARC nella linea cellulare Daoy con e senza trattamento con il DAPT per 12h. I primers utilizzati e i loro valori di DDct delle relative espressioni sono presentati in tabella 1.

Figura 14 mostra che il mir-199-b-5p interferisce con il potenziale di ancoraggio delle cellule Daoy iniettate nel cervelletto di topo: **A)** Analisi *in-vivo*

di bioluminescenza del topo 199b-Luc1 in cui erano state iniettate cellule Daoy overesprimenti il miR-199b tramite IVIS. (vedi topo #3; vedi dati addizionali in Fig. 4F). Il topo è stato scannerizzato una volta ogni settimana per un totale di 8 settimane. **B)** Misurazione del BLI (fotoni/sec/cm⁻²) di topi che portano cellule infettate con ADV5-199b mostrano una diminuzione dei valori di bioluminescenza alla ottava settimana. **C)** L'immagine è stata presa tramite lo spettro dell'IVIS impostato tra i 560nm e i 660nm per generare una topografia del soggetto. Il topo xenograft Ctl-Luc-4 Adv5-Mock viene mostrato su un asse 3D (x,y,z), con un estensione dei bordi del tumore mostrata in paragone ad un atlante digitale che ha permesso di mostrare uno scheletro e gli organi con una ricostruzione, usando il software Living Images. **D)** Come precedentemente descritto, sono state prese su topi Ctl-luc Adv5 199b xenografts

Figura 15 mostra la mappa del vettore Adv5-CMV-KpnI-NotIpA 6217bp con la sequenza SEQ ID NO:1.

Figura 16 mostra la sequenza del vettore Adv5-CMV-KpnI-NotIpA 6217bp (SEQ ID NO:2).

ESEMPIO 1: Studio del ruolo di miRNA 199b-5p nei tumori

MATERIALI E METODI

Dichiarazione etica

Tutti gli animali sono stati condotti secondo le linee guida nazionali ed internazionali. L'approvazione è stata ottenuta dalle Istituzioni per la Cura degli Animali e comitato etico CEINGE - Università degli

Studi di Napoli Federico II, Protocollo #13 - 08/01/2007, e il Ministero della Salute Italiano, Dipartimento Sanità Pubblica Veterinaria DL 116/92, confermando che tutti gli esperimenti sono conformi alle norme regolamentari.

Analisi di citometria a flusso.

L'analisi di citometria a flusso in fase S, frazioni e cinetica del ciclo cellulare sono stati effettuati utilizzando un FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA) usando il software CELL Quest versione 3.3. Lo studio CD133 è stato effettuato utilizzando lo stesso strumento, con anticorpi di Miltenyi Biotec (Auburn, CA), in base alle istruzioni del produttore. In breve, le cellule sono state bloccate nel reagente bloccante dei recettori Fc e incubate con un anti-CD133/1(AC133)-anticorpo phycoerythrin (Miltenyi Biotec), per 10 minuti al buio a 4°C. Le cellule sono poi state lavate e risospese in PBS. Le cellule che esprimono livelli più elevati di CD133 rispetto all'immunoglobulina G (IgG) controllo sono state considerate positive. Per le analisi della popolazione isolata, le cellule (10⁶/mL) sono state incubate con Hoechst 33342 (5 µmol / L; Sigma) per 90 minuti a 37°C in EMEM contenente il 2% di FBS. Per garantire la corretta identificazione della parte di popolazione di cellule, le cellule sono state incubate, come sopra, con l'aggiunta di 50 µM di verapamil (Sigma).

Immagini in-vivo attraverso cloni stabili di Daoy luciferasi.

Cloni stabili di cellule Daoy sono stati generati trasfettando un vettore esprimente luciferasi (il gene luciferasi della lucciola clonato nel vettore plentiV5; Invitrogen) in clone stabile 199bSC1 o nel clone controllo col vettore vuoto. Per quanto riguarda lo xenotrapianto sottocutaneo, 100,000 cellule vitali 199b-Luc1 e Ctrl-Luc-4 sono state mescolate con 1:1 PBS:soluzione matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA). Topi di sesso femminile atimiche di sei settimane di età sono state precedentemente anestetizzate utilizzando l'avertin (Sigma) come una soluzione al 3% in alcool terz-amilico (Fisher), con dose di 3 mg per 10 g di peso corporeo poi iniettato s.c. ,in ogni fianco dell'animale con un volume totale di 0,1 ml di cellule in sospensione matrigel PBS. Per quanto riguarda lo xenotrapianto ortotopico diretto nel cervelletto è descritto in un protocollo da Schabet M. et al., [55], è stato utilizzato per fornire cellule di MB dopo l'esposizione microchirurgica della membrana atlanto-occipitale, 50 µl di liquido cerebrospinale è stato aspirato attraverso un ago 27 G e replicato da 50 µl di DMEM contenente 100,000 cellule di medulloblastoma DAOY. La ferita è stato suturata con 3-0 polyglactin 910, e silk 4-0. I topi sono stati fotografati dopo l'impianto di cellule, per monitorare la crescita tumorale dalle acquisizioni settimanali di bioluminescenza (BLI) utilizzando un IVIS 3D Illumina Imaging System (Xenogen Corp. Alameda, CA). Per le acquisizioni, i topi sono stati anestetizzati con isofluorane i.p., iniettato con 100 µL D-luciferin (15

mg/mL stock) per 10 g di peso corporeo, e fotografato per 30 s, 10 minuti dopo l'iniezione di luciferina; sono stati fatti quattro acquisizioni per il topo (ventrale, dorsale e ciascun fianco). Per quantificare la bioluminescenza, i flussi integrati dei fotoni (fotoni per s) all'interno di ogni area di interesse sono stati determinati utilizzando il pacchetto software Living Images 3.0 (Xenogen-Caliper). L'emissione dei dati a partire dall'inizio della crescita tumorale sono stati raccolti per un periodo di almeno 6 settimane, e poi sono stati normalizzati con la bioluminescenza del giorno di iniezione. Le misurazioni Calliper delle dimensioni del tumore sono state effettuate ogni settimana, e le stime dei loro volumi sono stati effettuati utilizzando la formula: $\text{ampiezza} \times \text{lunghezza} \times 0,52$.

Gli animali sono stati monitorati quotidianamente, dal peso agli esami neurologici per determinare il loro status standard di buona salute. Gli animali che presentano segni di sofferenza sono stati prontamente sacrificati. Il giorno 63, dopo l'iniezione delle cellule, tutti gli animali sono stati sacrificati con un'overdose di ketanest e xylazin.

Preparazione degli animali e PET / CT imaging.

I topi sono stati tenuti in una gabbia ventilata (26 °C) per 1 h prima dei studi di imaging. Anestesia è stata effettuata con la somministrazione intraperitoneale di una miscela di ketamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) (il volume di iniezione, 100 µl/10 g). La PET è stata effettuata 1 ora dopo la

somministrazione di 3'-deoxy-3'-[18F]fluorothymidine ([18F]FLT), un marker del tumore di proliferazione (50 μ L; 7.4 MBq; tempi di scansione, 18 min) in una vena caudale laterale, usando uno scanner PET per animale (GE Healthcare eXplore Vista, FWHM 1.6mm). Studi CT ad alta risoluzione (GE Healthcare eXplore Locus; risoluzione spaziale, 45 μ m) sono state eseguite entro 24 ore dalla PET.

Analisi dei dati

Massimo (SUVmax) e media (SUVmean) standardizza la diffusione dei valori (SUV) sono state calcolate da studi PET ($SUV = \text{tessuto di attività (MBq/cc)} / [\text{dose iniettata (MBq)} / \text{peso corporeo (g)}]$). Le immagini PET/TC sono state elaborate per ottenere ricostruzioni multiplanar (MPRs), proiezioni di massima intensità (MIPs), il volume rendering 3D, e la fusione di immagini, usando Osirix 3,3 (MAC OS 10.5 sistema operativo). Ulteriori ricostruzioni 3D sono stati ottenuti utilizzando MicroView (GE eXplore Locus).

I volumi di lesione sono stati calcolati utilizzando i dati PET usando un software sviluppato "in casa" (basato su IDL, ITT Vis Inc), con riepilogo tutti voxels spazialmente collegati con $SUV > 50\%$ SUVmax. Profili di lesione definiti con tali procedure sono stati utilizzati per in confronto basato sul ROI tra Adv5-Mock e Adv5-199b.

I risultati presentati in Figura 5 (testo principale) hanno mostrato una massa tumorale con un difetto cranico, dovuto ad un elevato livello di tumorigenesi che si è verificato all'interno del cranio

ed un elevato livello di degenerazione cartilaginea delle ossa. In questa analisi PET-CT, abbiamo confermato la presenza di uno sviluppo di tumore più vasto nel cervelletto di topi di controllo (AdV5 Mock-# 7), rispetto ai topi xeno trapiantati esprimenti le cellule con miR-199b-5p (AdV5 - 199p # 5).

Culture cellulari standard.

Le linee cellulari Daoy e D283-MED MB sono state ottenute dall'American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) e sono state mantenute in colture con Eagle's minimum essential medium (EMEM; Sigma) supplementato con 10% siero bovino fetale (FBS), 10 U/ml penicillina e 0.1 mg/ml streptomycina (Celbio Pero, Milan, Italy). Le cellule HEK-293 e le SH-5YSY sono state mantenute in coltura in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma) supplementato con 10% FBS, 10 U/ml penicillina e 0.1 mg/ml streptomycina.

Trasfezione delle cellule Daoy e saggio luciferasico

Per determinare l'attività del miR-199b-5p sulla repressione dei costrutti fusi luciferasi-3'UTR, il costrutto pREYZO-miR-199b-5p e il suo costrutto target pRL-CMV-3'UTR sono stati cotrasfettati in cellule HEK293 in un rapporto di 10:1, usando il reagente Polyfect (Qiagen) insieme con il vettore pGL3 basic, in assenza ed in presenza del 2-OM (400 nM). Le attività luciferasiche sono state analizzate usando il sistema Dual Luciferase Reporter Assay system (Promega, Madison, WI).

Trattamento con AZA

Cinque linee cellulari di medulloblastoma (d283, Daoy, med8a, ons76, uw228) sono state cresciute in DMEM supplementato con in DMEM supplemented with 10% FBS e antibiotici. Ad una confluenza dell' 85%, al mezzo è stato aggiunto 5-aza-deoxycytidine (AZA) (Sigma) ad una concentrazione finale di 5 μ M. Dopo 72 h il mezzo è stato rimosso ed è stato aggiunto mezzo fresco con AZA. RNA è stato estratto usando il protocollo standard che prevede l'utilizzo del fenolo-cloroformio.

Clonaggio

Il Pre-miR-199b è stato clonato in un vettore pcDNA3 modificato (pREYZO) (D'angelo et al., 2004) usando siti di restrizione *EcoRI-XhoI*. I siti target di legame di HES1 e GSK-3 β (3'UTRs) sono state clonate in tandem nelle 3'UTR del vettore pRL-cytomegalovirus (CMV) (Promega, Madison, WI) a valle della regione codificante per la *Renilla luciferasi* (RL) nel sito *XbaI*. La 3'UTR di HES1 (che include anche il sito di legame dell'199b) è stata amplificata dal DNA gnomico con i seguenti primers senso e antisenso: HES1_3'UTR con AAAATCTAGACAGTTCGAAGACATAAAAGCC (SEQ ID NO:76) e HES1_3'UTR con AAAATCTAGAAACGCAGTGTACCTTCC (SEQ ID NO:77), ed è stata clonata nel vettore TK (Promega, Madison, WI) a monte del gene della luciferasi firefly, nei siti *XbaI*. Il cDNA full-length di HES1 è stato ottenuto con un approccio standard di RT-PCR da un cDNA di Daoy.

Mutagenesi sito-specifica

La mutagenesi sito-specifica del sito di legame del miR-199b-5p nella 3'UTR di HES1 è stato generato

seguendo il protocollo del kit QuikChange site-directed mutagenesis (Stratagene, La Jolla, CA). I seguenti primers sono stati utilizzati per la mutagenesi (è riportata solo la sequenza senso, e il nucleotide nella sequenza consenso è sottolineato): HES1 3'UTR senso AACAGGA^{ACTTGAATATTTGTAGAGAAGAGGACTTT} (SEQ ID NO:78).

Saggio TaqMan miRNAs

Reazione di trascrittasi inversa

Le reazioni di trascrittasi inversa contengono 40 ng di campione di RNA, 50 nM stem-loop RT primer, 1x RT buffer (P/N:4319981, Applied Biosystems), 0.25 mM di ogni dNTPs, 3.33 U/ml MultiScribe RT (P/N: 4319983, Applied Biosystems) and 0.25 U/ml inibitori di RNase (P/N: N8080119; Applied Biosystems). Le reazioni di 15 µl sono state incubate nell' Applied Biosystems 9700 Thermocycler per 30 min a 16 °C, 30 min a 42 °C, 5 min a 85 °C, e poi tenute a 4 °C.

Real-time PCR

Gli esperimenti di Real-time PCR sono stati allestiti usando il protocollo del kit standard TaqMan PCR su un Applied Biosystems 7900HT Sequence Detection System. I 20 µl della mix di PCR includono 3 µl di prodotto di RT, 10 µl di TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.2 mM del probe TaqMan. Le reazioni sono state incubate in una 96-well plate a 95 °C per 10 min, seguita da 60 cicli di 95 °C per 15 s e 60 °C per 1 min.

Estrazione dell'RNA, preparazione del cDNA e PCR real-time

L'RNA totale è stato estratto dalle linee cellulari usando il reagente Trizol (Invitrogen). In particolare, l'RNA è estratto dai campioni di siero con metodica citata in Xi Chen et al. [70]. La sintesi del cDNA dall'RNA totale (4 µg) è stata ottenuta usando il Super Script II First Strand Kit (Invitrogen). La PCR Real-time quantitativa è stata allestita usando i protocolli standard con Applied Biosystems ABI PRISM 7900HT Sequence Detection system. Per calcolare l'espressione genica relativa del precursore del miR-199b-5p, l'ammontare relativo di ogni pre-miRNA è stato normalizzato sul miRNA di U6; gli altri geni sono stati normalizzati usando il gene della β -actina. I Primers per ogni gene utilizzati per la Real-time PCR sono stati disegnati usando il software Primer Express versione 2.0 (Applied Biosystems). Le sequenze dei primers per amplificare il precursore del miR199b-5p sono:

HSA pre-miRNA199b F: CGGGAATTCCCAGAGGACACCTCCAC (SEQ ID NO:3)

HSA pre-miRNA199b R: CGGCTCGAGCCGAGGGTCTAACCCAG (SEQ ID NO:4)

In particolare possono essere utilizzate le sequenze metodiche:

a) Tecnica real time PCR Syber green:

Dall'RNA totale è stato ottenuto il cDNA a singolo filamento utilizzando il kit Invitrogen. La reazione di retrotrascrizione è effettuata dall'enzima SuperScript II. Per diminuire l'errore sperimentale è stata preparata una mix contenente per ogni campione:

- 2 µL di esameri random 50 ng/µl
- 1 µL di dNTP 10 mM

Sono stati retrotrascritti 4 µg di RNA totale in un volume di 7 µL a cui sono stati aggiunti 3 µL della mix ottenendo un volume finale di 10 µL. I tubini sono stati incubati a 65°C per 5 minuti per denaturare l'RNA e consentire agli esameri di appaiarsi. I campioni sono poi stati posizionati 1 minuto a 4°C. Successivamente ad ogni tubino sono stati aggiunti 9 µL di una seconda mix contenente:

- 2 µL di tampone RT 10X
- 4 µL di MgCl₂ 25 Mm
- 2 µL di DTT 0,1 M
- 1 µL di RNasi OUT (40 U/µl)

La miscela di reazione è stata mescolata ed incubata a 25°C per 2 minuti. Successivamente sono state aggiunte 50 unità dell'enzima SuperScript II e la reazione è stata incubata a 25°C per 10 minuti. I campioni sono stati incubati poi 50 minuti a 42°C e 15 minuti a 70°C per inattivare gli enzimi. Ai tubini posti in ghiaccio è stato aggiunto 1 µL di RNasi H (2 U/µl). La reazione è stata incubata per 20 minuti a 37°C, così che la RNasi H potesse degradare il filamento di RNA stampo riconoscendo l'eteroduplex DNA-RNA. I campioni sono stati quindi conservati ad una temperatura di -20°C.

Per calcolare l'espressione genica relativa del precursore del miR-199b-5p, l'ammontare relativo di ogni pre-miRNA è stato normalizzato sul miRNA di U6 (mMU6). I Primers utilizzati per la Real-time PCR sono stati disegnati usando il software Primer Express

versione 2.0 (Applied Biosystems). Le sequenze dei primers per amplificare il precursore del miR199b-5p e del normalizzatore sono:

HSA pre-miRNA199b F: CGGGAATTCCCAGAGGACACCTCCAC (SEQ ID NO:3)

HSA pre-miRNA199b R: CGGCTCGAGCCGAGGGTCTAACCCAG (SEQ ID NO:4)

mMU6 FOR: GAA AAG CCT TGT TTG TGC TTG C (SEQ ID NO:5)

mMU6 REV: GGG CCA TGC TAA TCT TCT CTG T (SEQ ID NO:6)

oppure dopo la retrotrascrizione si può analizzare l'espressione del mir 199b-5p mediante saggio taqman con i seguenti primers e probe:

199b PRIMER F: AGGACACCTCCACTCCGTCTAC (SEQ ID NO:7)

199b PRIMER REV: GCCTAACCAATGTGCAGACTACTG (SEQ ID NO:8)

199b PROBE: CAGTGTTTAGACTATCTGTTTCAGGACTCCCAAATTG (SEQ ID NO:9)

Le reazioni di Real-Time PCR sono state condotte impiegando il kit SYBR Green Master Mix (Applied Biosystem) e piastre formate da 96 pozzetti. Per minimizzare gli errori dovuti alla variabilità degli strumenti, è stata allestita, per ogni gene, una *mix* comune ad tutti i campioni. Il volume finale di ciascuna reazione è stato di 25 µl costituiti da:

- primer forward 600 nM
 - primer reverse 600 nM
 - Master mix SYBER-GREEN usata alla concentrazione finale 1X
 - H₂O sterile
 - 100 ng di DNA
- b) TaqMan PCR real time

L'RNA totale viene retrotrascritto tramite la seguente reazione di trascrittasi inversa: Le reazione di trascrittasi inversa contengono 40 ng di campione di RNA, 50 nM stem-loop RT primer, 1x RT buffer (P/N:4319981, Applied Biosystems), 0.25 mM di ogni dNTPs, 3.33 U/ml MultiScribe RT (P/N: 4319983, Applied Biosystems) and 0.25 U/ml inibitori di RNase (P/N: N8080119; Applied Biosystems). Le reazione di 15 µl sono state incubate nell' Applied Biosystems 9700 Thermocycler per 30 min a 16 °C, 30 min a 42 °C, 5 min a 85 °C, e poi tenute a 4 °C.

Gli esperimenti di Real-time PCR sono stati allestiti usando un Applied Biosystems 7900HT Sequence Detection System. I 20 µl della mix si PCR includono 2 µl di prodotto di RT, 10 µl di TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0.2 mM del probe TaqMan. Le reazioni sono state incubate in una 96-well plate a 95 °C per 10 min, seguita da 60 cicli di 95 °C per 15 s e 60 °C per 1 min. I primer utilizzati sono:

199b Tagman Rev

CCCAGTGTTTAGACTATCTG (SEQ ID NO:10)

199b Tagman for

GAGACCCGCGGAAATC (SEQ ID NO:11)

199b taqman Probe

GCTCCCGCACCGCGGGTCTCGA (SEQ ID NO:12)

Staminalità e geni coinvolti nella biologia delle cellule staminali cancerose, e geni associati allo sviluppo del tumore MB in una linea cellulare di Mb Daoy che overesprimono il miR-199b-5p endogeno dopo

trattamento con DAPT.

I geni coinvolti nella biologia delle cellule staminali sono stati selezionati per studiare la loro espressione dopo overespressione del miR-199b-5p. L'Unigene ID e la sequenza dei primers usati per l'analisi di real-time PCR sono mostrati in tabella insieme ai valori di $2^{-\Delta Ct}$ ottenuti da analisi di cellule Daoy trattate con DAPT per 12h e analizzate con lo strumento 7900 Real Time TaqMan Applied Biosystem (vedere tabella 1)

TABELLA 1

Nome del gene	ID banca dati Unigene	Primer senso	Primer antisenso	Daoy + DMSO	Daoy + DAPT 12h
c-Myc	Hs.202453	ATGAGGAGACACCGCCAC (SEQ ID NO:24)	AACATCGATTTCCTCT (SEQ ID NO:25)	0.0987097	0.0542671
Nanog	Hs.661360	GCAAAATGTCTCTGCTGA (SEQ ID NO:26)	GCTGTCTGAATAAGCA (SEQ ID NO:27)	0.0001832	0.0004488
CD 133	Hs.614734	CTATGTGGTACAGCCGCG (SEQ ID NO:22)	TAATCAATTTTGGATTCT (SEQ ID NO:23)	0.0020653	0.0012368
Oct4	Hs.249184	ACTGCAGCAGATCAGCCA (SEQ ID NO:28)	TGGCGCCGGTTACAGAA (SEQ ID NO:29)	0.0001200	0.0007941
PDGFR- B	Hs.509067	AGGTTGCTGACGAGGGCC (SEQ ID NO:84)	GGTGTGACTTCATTCA (SEQ ID NO:85)	0.0006059	0.0000606
PDGFR- A	Hs.74615	TCAAGGCAGAAATAGGCA (SEQ ID NO:86)	TGGACGTCGATCAGGTC (SEQ ID NO:87)	0.0000003	0.0000015
SPARC	Hs.708558	TTGCCTGGACTCTGAGCT (SEQ ID NO:88)	GGGTGACCAGGACGTTCT (SEQ ID NO:89)	0.3431687	0.0797725
ILF3	Hs.465885	CCGACACGCCAAGTGGTT (SEQ ID NO:90)	ACACAAGACTTCAGCCCCG (SEQ ID NO:91)	0.0352218	0.0425171
MYBL2	Hs.179718	AGCAAGTGCAAGGTCAAA (SEQ ID NO:92)	GGCCCTCAGCTGCTCGT (SEQ ID NO:93)	0.0130289	0.0039321
TEAD4	Hs.94865	TCGGACGAGGAGGGCAAGA (SEQ ID NO:94)	GATGTAGCGGGCAATCAG (SEQ ID NO:95)	0.0117936	0.0051764
TCF7L1	Hs.516297	CCGCGGGACTATTTTCGCT (SEQ ID NO:30)	AAAGAACGCGCTGTCCT (SEQ ID NO:31)	0.0006742	0.0001026
HMGA1	Hs.518805	AAAAACAAGGTGCTGCCA (SEQ ID NO:36)	CCTTCCTGGAGTTGTGGT (SEQ ID NO:37)	0.7977002	0.0048793
ZIC1	Hs.598590	CAGTTCGCTGCGCAAACA (SEQ ID NO:32)	GAGCCCTGCGAGGAGGA (SEQ ID NO:33)	0.0283592	0.0002784
HMGB3	Hs.19114	TTTTCCAAGAAGTGCTCTG (SEQ ID NO:38)	TTTCTCTTCCCGGACAT (SEQ ID NO:39)	0.1946868	0.0055773

KLF5	Hs.5082	GCATCCACTACTGCGATT	TGAGAAGACTTGGTATA
	34	CCC (SEQ ID NO:34)	ACTTTTGTGC (SEQ ID NO:35)
			0.0027895 0.0236774

Western blotting

Trenta µg di lisato citosolico o nucleare sono stati corsi in gels di poliacrilammide al 12%, e blottati su membrane di polyvinylidene difluoride (PVDF; BioRad, Milan, Italy). Le membrane sono state poi successivamente incubate con l'anticorpo *anti-HES1* (gentile concessione del Dr.Tetsuo Sudo TORAY Industries, Tebiri Kamakura, Japan), un anticorpo policlonale fatto in coniglio (alla diluizione di 1:500), e con un anticorpo anti-GSK3-β (B&D Bioscience) anticorpo monoclonale (1:2500), con un anticorpo anti-c-Myc anticorpo policlonale fatto in coniglio (1:200) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), con un anticorpo anti-GABRA6 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) (1:200), con un anticorpo anti-MATH3 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) (1:200) e con un anticorpo policlonale anti-cyclin D1 (1:200) fatto in coniglio (Cell Signaling). Un anticorpo anti-β-actina (1:1.000) (Sigma) è stato usato come controllo per verificare la simili quantità di lisati citosolici caricati su gel ed un anticorpo anti-β-laminina (1:50) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) per controllare i lisati nucleari.

Saggi in Soft-agar

Le cellule Daoy e il clone stabilec 199b sono stati coltivati in 1 ml EMEM supplementato con 2% FBS, contenente 0.3% agarosio. Le colture sono state mantenute per due settimane ed è stato cambiato il

mezzo con mezzo fresco circa due volte a settimana. Le colonie con un diametro maggiore di 100 μm sono state contate con un microscopio Leica (Nussloch, Germany) DC500.

Saggio di proliferazione MTS

La proliferazione cellulare è stata determinata usando il CellTiter96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Kit (Promega Madison, WI). Le cellule sono state pilastrate in 96-well plates ad una densità di 1×10^3 cells/well in EMEM senza o con FBS. Dopo 0, 24, 48 e 72 h, MTS ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]) e PMS (phenazine methosulfate) sono stati aggiunti ad ogni well e dopo 4 h è stata misurata l'assorbanza di ogni well a 490 (OD_{490}) usando Multilabel counter Victor³ (Perkin Elmer). Ogni condizione è stata allestita in cinque well e ogni esperimento è stato ripetuto due volte.

Immunoistochimica

Lo smascheramento antigenico è stato ottenuto usando 10mM buffer pH 6, a 97 °C fper 45 min. Il blocking è stato ottenuto usando l'Antibody Diluent with Background Reducing Components (Dako Cytomation) per 30 min a temperatura ambiente; gli anticorpi policlonali anti-HES1(1:1000), anti-Nestin (1:1000), anti-GABRA6 (1:100), anti-MATH3 (1:100) sono stati usati overnight a 4 °C. I segnali sono stati rilevati usando il Kit LSAB DAKO, per 15 min (Biotina), e Kit LSAB DAKO, per 15 min (Streptavidina), a temperatura ambiente. Dopo colorazione con la DAB DakoCytomation,

le slides sono state montate ed esaminate al microscopio Leica (Nussloch, Germany) DC500.

Rivelazione di acidi nucleici tramite ibridazione in-situ

Le slides di cervelli embrionali murini o TMA umani sono stati fissati in 4% paraformaldeide per 10 min a temperatura ambiente, e lavati due volte per 3 min in PBS 1x a temperatura ambiente. Durante gli steps di lavaggio, è stata preparata la soluzione di acetilazione fresca, contenente: 0.01% triethanolamina e 0.0025 mM anidride acetica in acqua con diethylenepyrocarbonate (DEPC). Le slides sono state poi riposte in un beaker contenente la soluzione di acetilazione e agitate gentilmente per 10 min. Le slides sono poi state sottoposte a trattamento con Proteinasi K alla concentrazione di 5 µg/ml in acqua DEPC, successivamente sono stati fatti 3 lavaggi per 3 min in PBS 1x a temperatura ambiente, e si è passati alla fase di pre-ibridizzazione per 6 h a temperatura ambiente con la soluzione di ibridazione. L'ibridazione è stata fatta con 150 µl di denaturizing hybridization, con 1 pM di probe locked nucleic acid DIG-labelled (Exiqon, miRCURY). Ibridazione è stato allestita a 60 °C overnight. Le slides sono state lasciate in una soluzione di 5x SSC preriscaldata a 60 °C 5x SSC e le coverslips sono state rimosse con cura; le slides sono state poi incubate in 0.2x SSC a 60 °C per 1 h, poi incubate in 0.1 M Tris, pH 7.5, 0.15 M NaCl a temperatura ambiente per 10 min. Il surplus della soluzione è stato rimosso e le slides sono state poste

in una camera umidificata; 500 μ l di soluzione di blocking (1% FCS in 0.1 M Tris, pH 7.5, 0.15 M NaCl) sono stati posti sulle slides per un tempo di incubazione di 1 h a temperatura ambiente. L'anticorpo fosfatasico alcalino anti-DIG è stato diluito 1:2,000 nella soluzione di blocking e incubato a 4 °C overnight. Le slides sono state lavate tre in 0.1 M Tris, pH 7.5, 0.15 M NaCl, e poi equilibrate in 0.1 M Tris, pH 9.5, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl. Le slides sono state colorate con BCIP/NTB (Sigma), deidratate, e montate; le immagini sono state acquisite con un microscopio Leica (Nussloch, Germany) DC500.

Trattamento con DAPT di cellule Daoy

La linea cellulare di Daoy è stata ottenuta dall'American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) e mantenuta in coltura in EMEM (Sigma Aldrich, Milan, Italy) supplementato con 10% fetal bovine serum (FBS) (Celbio Pero, Milan, Italy), 10 U/ml penicillina e 0.1 mg/ml streptomycina (Celbio Pero, Milan, Italy).

Le cellule HEK-293 e SH-5YSY sono state mantenute in coltura in in DMEM (Sigma) supplementato con 10% FBS (Celbio), 10 U/ml penicillina e 0.1 mg/ml streptomycina (Celbio). Il trattamento delle cellule Daoy con il *N*-[*N*-(3,5-difluorophenacetyl)-*L*-alanyl]-*S*-phenylglycine *t*-butylester (DAPT (Sigma-Aldrich) è stato allestito come segue: le cellule sono state pilastrate e lasciate crescere overnight nel mezzo contenente 10% FBS. Il giorno successivo, il mezzo è stato rimpiazzato con mezzo contenente 10 μ M DAPT e cambiato ogni 4 ore circa. I saggi di espressione sono

stati ottenuti dopo 0, 6, 12, 24 h di trattamento, usando condizioni controllo tra cui un ugual volume DMSO.

Saggio in vitro di motilità cellulare

La linea cellulare controllo Daoy e il clone stabile DAOY-199bSC1 sono state usate nel saggio di motilità cellulare. Il saggio di migrazione cellulare è stato allestito utilizzando Transwells con pori di 8- μ m (Costar). Le cellule sono state risospese tramite tripsinizzazione, lavate, e risospese in 100 μ l DMEM senza siero contenente 0.1% BSA (5×10^4 cellule) e poste nel cestello superiore delle Transwells. Il cestello inferiore è stato riempito con 600 μ l di DMEM supplementato con 0.5% FBS, come chemioattrattore. Le cellule sono state lasciate migrare per 1 h a 37 °C. Le cellule migrate nella zona sottostante della membrana di policarbonato sono state fissate con 2.5% glutaraldehyde e colorate con una soluzione di ematossilina (Sigma). Le cellule sono state contate, e le analisi sono state fatte su tre Transwells per ogni condizione, e ogni esperimento è stato ripetuto due volte.

Campioni tissutali

Un totale di 61 casi di MB sono stati collezionati da tre differenti centri: 12 campioni chirurgici di MB provenienti dal Dipartimento di Neurochirurgia dell'Ospedale Santobono, Napoli, Italia; 18 dall'Istituto Curie, Parigi, Francia; e 31 dall'Ospedale Sick Children, Toronto, Canada. Le caratteristiche dei pazienti sono riportate nella

Tabella 2.

TABELLA 2

Paziente	età alla diagnosi (mesi)	Follow-up (mesi)	Stato all'ultima visita	Stadio M (Chang)	Istologia	Espressione relativa del Mir- 199b-5p (suU6) $2^{-\Delta\Delta Ct}$
MB102	108	32.8	morto per la malattia	M3	classico	0.00099561
MB108	96	19.5	CR1	M0	desmoplastico	0.09001227
MB106	50	4	morto per la malattia	M0	classico	0.010613742
MB111	9	72.2	CR1	M0	desmoplastico	0.120138583
MB114	21	74.6	CR1	M0	desmoplastico	0.000383771
MB119	93	32.8	CR1	M1	classico	0.003199194
MB120	108	27.5	CR1	M0	classico	0.218701701
MB123	37	13.6	morto per la malattia	M3	classico	0.006959284
MB126	13	74.8	CR2	M0	classico	0.067296233
MB128	78	31.7	CR1	M0	desmoplastico	0.076875702
MB133	158	87	CR1	M0	classico	0.025786457
MB137	93	84	CR1	M0	classico	0.019919437
MB79	36	14.1	morto per la malattia	M0	medullo- myoblastoma	0.194622694
MB80	96	43.1	CR1	M2	desmoplastico	0.000152879
MB81a	109	14	morto per la malattia	M0	grandi cellule	0.019211033
MB95	41	32.1	CR1	M0	classico	0.002433079
MB96	44	42	morto per la malattia	M0	classico	0.004037267
MB99	99	21.9	morto per la malattia	M0	classico	0.015258058
N1	69	49	CR1	M2	classico	0.005729706
N2	90	20	CR1	M0	classico	0.206256346
N3	26	34	CR1	M0	desmoplastico	1.770829272
N4	124	14	CR1	M0	classico	0.014508728
N5	64	36	PR	M0	classico	0.386116248

N6	35	1	morto per la malattia	M3	grandi cellule	0.007290413
N7	76	22	CR1	M0	classico	0.009490309
N8	169	26	CR1	M0	classico	0.066566636
N9	128	10	CR1	M0	classico	0.379446328
N10	29	20	PD	M0	classico	0.032431549
N11	140	34	CR1	M0	classico	0.097916916
N12	34	19	PD	M0	desmoplastico	0.034231549
MDT-MB-1	25	6	morto per la malattia	M+(1-2- 3)		1.574119241
MDT-MB-2				M+(1-2- 3)		0.012369684
MDT-MB-3				M0		0.408535751
MDT-MB-4				M0		0.014345797
MDT-MB-5				M+(1-2- 3)		0.117424185
MDT-MB-6	27	33	morto per la malattia	M0	desmoplastico	1.924140125
MDT-MB-7	88	14	morto per la malattia	M0	anaplastico	0.369604567
MDT-MB-8	124	39	vivo	M0	anaplastico	0.499210685
MDT-MB-9	39	95	vivo	M0		0.085790892
MDT-MB-38	60	78	vivo	M0		0.019155739
MDT-MB-46				M0		1.875853287
MDT-MB-50				M+(1-2- 3)		0.043612817
MDT-MB-71				M0		0.07458206
MDT-MB-100	32	34	vivo	M0		0.645850534
MDT-MB-102	26	33	vivo	M+(1-2- 3)	anaplastico	0.020193158
MDT-MB-103	65	33	vivo	M0		0.130267521
MDT-MB-118	109	32	vivo	M+(1-2- 3)	anaplastico	1.776616235
MDT-MB-124				M0		0.902823686
MDT-MB-131				M+(1-2- 3)		0.277894072
MDT-MB-154				M+(1-2- 3)		0.03848591
MDT-MB-174				M+(1-2- 3)		0.016130305
MDT-MB-175				M0		0.821566771
MDT-MB-177				M+(1-2- 3)		0.004737906
MDT-MB-193				M+(1-2- 3)		0.142617576

- 50 -

MDT-MB-194				M+(1-2-3)		0.484220261
MDT-MB-201				M0		0.053878318
MDT-MB-207	61	110	vivo	M0		0.025498266
MDT-MB-220	69	20	vivo	M0		1.119673662
MDT-MB-222	72	20	vivo	M+(1-2-3)		0.050742316
MDT-MB-223	131	20	vivo	M0		0.374030612
MDT-MB-224	167	13	morto per la malattia	M0	anaplastico a grandi cellule	1.02682E-10
2M2	10	26	CR1	M0	Classico	0.007714069
2M16	9	72	vivo	M0	Classico	0.001090312
4M1	1	3	morto per la malattia	M0	Classico	0.022951675
4M10	8	8	vivo	M1	Classico	0.000362543
4M11	9	6	0	M3	Classico	0.012582419
4M12	5	58	0	M0	Classico	0.003358695
4M13	16	14	0	M0	Classico	0.280568718
4M15	9	14	CR1	M1	Classico	0.066604933
4M16	9	18	vivo	M0	Classico	0.004022173
4M17	8	24	vivo	M3	Classico	0.182681185
4M18	14	22	vivo	M0	Grandi cellule	0.245240791
4M19	10	62	vivo	M3	Classico	0.072460116
4M2	6	12	vivo	M0	Classico	0.055299918
4M20	5	26	vivo	M1	Classico	0.001948092
4M21	2	31	vivo	M3	grandi cellule	0.043166742
4M22	4	27	vivo	M3	classico	0.001217318
4M23	11	17	morto per la malattia	M2	classico	0.034755336
4M26	10	12	vivo	M0	classico	0.066137644
4M27	8	36	vivo	M2	classico	0.052555486
4M28	16	49	CR1	M0	classico	0.017134081
4M3	9	24	vivo	M3	classico	0.173909476
4M30	6	14	vivo	M0	classico	0.000593161
4M31	6	50	vivo	M0	classico	0.199915108
4M32	3	48	vivo	M0	classico	0.203934051
4M33	1	36	vivo	M0	classico	0.080160885
4M35	6	36	vivo	M0	classico	0.020431867
4M36	2	36	vivo	M3	classico	0.102537563
4M37	3	48	vivo	M1	classico	0.01621208

- 51 -

4M38	8	15	morto per la malattia	M2	classico	0.000346883
4M39	7	18	vivo	M0	classico	0.014986991
4M4	7	60	vivo	M0	classico	0.161266704
4M40	10	36	vivo	M0	classico	0.001348005
4M41	12	36	vivo	M0	classico	0.057124436
4M42	6	18	vivo	M0	classico	0.032851388
4M43	14	16	vivo	M3	classico	0.033246248
4M44	8	22	vivo	M3	grandi cellule	0.228057449
4M48	11	12	vivo	M3	classico	0.014309066
4M49	6	20	CR1	M3	classico	0.007560172
4M5	7	18	vivo	M0	classico	0.003118728
4M50	6	41	vivo	M0	classico	0.131638757
4M55	12	36	vivo	M0	classico	0.011346624
4M58	3	15	morto per la malattia	M3	grandi cellule	0.003100982
4M6	10	26	vivo	M0	classico	0.017322564
4M7	4	20	vivo	M1	classico	0.008736515
4M8	8	12	vivo	M0	classico	1.065853534
4M9	8	26	vivo	M0	classico	0.007555274

Continuo tabella 2

Codice del paziente	età al decesso (mesi)	Espressione del Mir-199-5p su U6 2 [^] -Dct
Gruppo 1-2 anni di età		
1210	0.2	0.028323341
1157	0.02	0.091384778
1102	0.39	0.010811309
779	0.005	0.009558291
814	1.41	0.031308608
Gruppo 13-16 anni di età		
1297	15.81	0.001938772
1158	16.63	0.001053237
1065	15.29	0.002201934
1024	14.6	0.000768088
931	13.12	0.003939267
142	16.73	0.000206487

Il consenso informato è stato ottenuto prima delle

analisi dei campioni tumorali. Tutti i campioni sono stati ottenuti al momento della diagnosi, prima di trattamenti di radioterapia o chemioterapia, e 29 sono stati soggetti ad analisi istopatologica in accordo con i criteri del WHO [69], le informazioni sullo stato M sono a disposizione per tutti i pazienti. Tessuti umani di controllo sono stati ottenuti dal NICHD Brain and Tissue Bank for Developmental Disorders all'Università del Maryland, Baltimora, Maryland. L'RNA totale è stato estratto usando il reagente Trizol (Invitrogen), come sopra descritto per le linee cellulari, e analizzato per i livelli di espressione del miR-199b-5p attraverso saggi TaqMan MicroRNAs. I livelli di espressione del miR-199b-5p sono stati divisi in due gruppi (alti e bassi), in accordo con la mediana, e sono stati comparati tra i gruppi metastatici e non metastatici usando il Pearson Chi-Square test. Analisi di sopravvivenza sono state ottenute attraverso il software SPSS, usando un Log-rank test per accertare la rilevanza statistica. La rilevanza statistica è stata stabilita con un *P* value di 0.05.

Costruzione degli Adenovirus

La sequenza del miR199b 5'-XhoI, 3'-HindI III è stata direttamente clonata nel vettore Ad5-CMV-KNpnI-NotIpA, poi l'industria Innovative Adenovirus Technologies and Reagents, ha provveduto alle relative ricombinazioni e la costruzione dell'adenovirus 199b, (vedere figura 16 che mostra la sequenza del vettore SEQ ID NO: 2 e figura 15 che mostra il vettore con inserita la sequenza SEQ ID NO: 1).

Infezione adenovirale

L'infezione con i virus ricombinanti è stata effettuata esponendo le cellule all'adenovirus in 500µl di mezzo di coltura cellulare completo per 1h, seguita poi dall'aggiunta di altro mezzo. Abbiamo usato l'espressione della GFP dell'adenovirus (AdV MOCK e AdV 199b) come un controllo per determinare l'efficienza dell'infezione.

Eterotrapianto nel ventricolo destro del cervelletto di topi SCID

Per stabilire un modello xenograft intracerebellare, topi di 6-8 settimane sono stati anestetizzati con Tribromoetano (Avertin®) (50 mg/kg); e dopo ciò, attraverso una piccola incisione sulla pelle (1 mm) ed è stato realizzato un piccolo foro (0.7 mm di diametro) con un trivello da microchirurgia (Fine Science Tools, Foster City, CA). Le cellule Daoy Luc infettate con l'adenovirus mock, con l'adenovirus 199b ed i cloni stabili 199b LUC1 (10^5) sono stati risospesi in 5 µL di PBS ed iniettate lentamente attraverso il piccolo foro nell'emisfero destro del cervelletto (coordinate stereotattiche dal bregma anteroposteriore 5.5 mm; detrolaterale 2.1 mm; dorsoventrale 5.0 mm) usando un ago da siringa di 10-AL, 26-gauge Hamilton Gastight 1701 che è stato inserito perpendicolare alla superficie craniale. Gli animali sono stati monitorati settimanalmente tramite la bioluminescenza per valutare la crescita del tumore per 8 settimane.

Acquisizioni 3D

L'IVIS Spectrum: questo sistema consente l'acquisizione fotografica e strutturale di un'immagine luminosa, e due o più immagini bioluminescenti a differenti lunghezze d'onda (da 560 a 660 nm), e genera la topografia superficiale (mesh) del soggetto. Modificando specifici parametri dell'algoritmo DLIT su cui può agire l'operatore (come ad esempio la lunghezza d'onda, la fonte dello spettro, e le proprietà del tessuto), si può ricostruire la posizione, la geometria e forza della fonte di luminescenza nel soggetto. Il software Living Image® fornisce gli atlanti digitali del topo che permette la visualizzazione dello scheletro e degli organi su una ricostruzione 3D.

PET e SPECT-TC degli animali

I topi sono stati anestetizzati con 2.5% isofluorano e lasciati sotto anestesia con 1% di isofluorano durante tutta la procedura di imaging. Il [^{18}F]FDG e [^{18}F]Fluoride PET imaging è stato usato per esaminare i cambiamenti metabolici e ossei indotti dalle cellule tumorali, rispettivamente. Le immagini sono state acquisite in tre posizioni (10 min per posizione per un totale di 30 minuti) e una risoluzione assiale di 1.2 mm, usando un sistema Explorer-Vista small animal PET-CT (GE Healthcare).

RISULTATI

Il miRNA 199b-5p silenzia l'espressione di HES1 legando la sua 3'UTR.

La nostra analisi *in-silico* tramite l'interrogazione del database mirBase [27] è stata volta all'identificazione dei miRNAs che potessero

avere come target HES1, un effettore del pathway di Notch. Il MiR-199b-5p e il miR-199a-5p avevano il migliore punteggio come potenziali regolatori di HES1. Abbiamo poi focalizzato la nostra attenzione sul miR-199b-5p per la sua capacità di diminuire l'espressione di HES1 dopo over-espressione transiente, comparata al miR-199a-5p (Fig. 9A, B). Il miR-199b-5p è perso nei tumori al polmone [28] e mappa in una regione genomica deleta nel tumore alla vescica [29]. Il miR-199a* (anche detto miR-199a-5p, con una sequenza identica al miR-199b-5p) è ridotto nel carcinoma epatico [30-32]. Le analisi di espressione del miRNA-199b-5p in due linee cellulari di MB, in tessuti adulti e in cervelletti murini sono mostrate nelle Fig. 9C, D and 10A, B.

Per determinare se HES1 fosse un target del miR-199b-5p, la regione 3'UTR è stata clonata in un vettore per saggio luciferasico ed il miRNA in un vettore di espressione. Nella linea cellulare HEK-293 è stato cotrasfettato il miR-199b-5p ed il costrutto reporter dimostrando che il miRNA lega la 3'UTR di HES1 (Fig. 9, Fig. 9E). Come controllo negativo, abbiamo utilizzato un costrutto, contenente la 3'UTR di HES1, mutato nel sito di legame per il miR-199b-5p (Fig. 9, Fig. 9E), ed un oligo 2-O'-methyl oligoribonucleotide (2-OM) complementare alla sequenza del miR-199b-5p maturo, che bilancia gli effetti del miR-199b-5p, ristabilendo l'attività luciferasica (Fig. 9, Fig. 9E). Risultati simili sono stati ottenuti nella linea cellulare di MB Daoy (Fig. 9, Fig. 9F).

Per studiare il ruolo del miR-199b-5p nella biologia del MB, il costrutto di espressione contenente il miR-199b-5p è stato trasfettato nella linea cellulare Daoy e sono stati ottenuti diversi cloni stabili overesprimenti il miR-199b-5p. La overespressione è stata confermata tramite real-time PCR (Fig. 9, Fig. 9G). Tre cloni stabili hanno evidenziato la riduzione di espressione di HES1, tra questi il clone 199bSC1 ha mostrato la completa assenza di HES1. I cloni 199bSC1 e 199bMC1 sono stati selezionati per i successivi studi funzionali (Fig. 9, Fig. 9H). Questi effetti sulla down regolazione di HES1 sono stati confermati anche nella linea cellulare di MB D283MED, trasfettata in maniera transiente con il miRNA-199b-5p (Fig. 9, Fig. 9B).

Per riconfermare ulteriormente questi dati, il clone 199bSC1 è stato trasfettato con l'oligoribonucleotide 2-OM usato come controllo negativo (Fig. 9, Fig. 9I). In questi esperimenti l'espressione di HES1 viene restaurata, suggerendo che l'oligo 2-OM blocca la repressione di HES1 operata dal miR-199b-5p, confermando ulteriormente che il miR-199b-5p regola direttamente HES1. Altri possibili targets del miR-199b-5p sono stati studiati (Fig. 9, Fig. 10C, D).

L'overespressione del miR-199b-5p riduce la proliferazione cellulare ed inficia il potenziale clonogenico delle cellule di MB.

I cloni stabili 199bSC1 e 199bMC1 hanno evidenziato una ridotta crescita cellulare se comparata

ai cloni di controllo. Per questi motivi abbiamo indagato eventuali alterazioni nel ciclo cellulare tramite analisi al FACS sul clone 199bSC1, che mostra una diminuzione di cellule in fase S del 31% ed un aumento delle cellule in fase G0-G1 del 15%, comparato al clone di controllo (Fig. 1A). Questo esperimento suggerisce che la ridotta proliferazione sia dovuta all'uscita delle cellule dalla fase S. Il clone 199bMC1 non mostra sostanziali cambiamenti nel ciclo cellulare, forse dovuta alla minore riduzione di HES1. Questo fenotipo al ciclo cellulare si traduce in una diminuzione di proliferazione valutata dal saggio di proliferazione MTS, comparando i cloni 199bSC1 e 199bMC1 con il clone controllo e le cellule trasfettate con l'oligo 2-OM contro il miR-199b-5p (Fig. 1B). Entrambi i cloni 199bMC1 e 1999SC1 mostrano una marcata riduzione di proliferazione. Gli stessi risultati sono stati confermati nelle linee cellulari D283 e ONS-76 (Fig. 10F). Gli effetti del miR-199b-5p sono stati anche confermati nella linea Daoy con l'oligo 2OM, dimostrando che l'oligo 2OM agisce anche sulla quota di miR-199b endogeno (Fig. 10G).

Gli effetti del miR-199b-5p sono stati valutati tramite l'analisi di marcatori di proliferazione e differenziamento tramite real time PCR. Come mostrato in Fig. 1C, MAP2, espresso nei neuroni maturi [33], è upregolato nei cloni stabili 199bSC1 e 199bMC1. La linea cellulare Daoy esprime GFAP dopo differenziamento con phenylbutyrate [34], in modo simile nel clone stabile 199bSC1, i livelli di GFAP sono aumentati.

L'espressione dei geni analizzati nei cloni stabili è in accordo con il fenotipo visto nei cervelli dei topi *HES1*^{-/-} [23]. Tra gli altri geni, *GABRA6*, un marcatore del differenziamento delle cellule granulari cerebellari è significativamente overespresso nei cloni stabili per il miR-199b-5p (Fig. 1C).

Durante la neurogenesi è fondamentale l'espressione di geni, quali *MASH1*, *MATH3* and *NGN2*, infatti, i topi knockout per *HES1* mostrano upregolazione di questi geni bHLHs [35]. Entrambi i cloni stabili per il miR-199b-5p mostrano un aumento di espressione dei geni bHLH. In accordo con la diminuzione di proliferazione, i geni *c-Myc* e *cyclin D1* sono diminuiti. Tra i cloni analizzati il clone 199bSC1 mostra il fenotipo più consistente per la marcata riduzione di espressione di *HES1*.

Abbiamo poi analizzato se l'espressione del miR influenzasse la crescita ancoraggio dipendente tramite un saggio clonogenico. Nel clone 199bSC1 c'è una riduzione dell' 80% nel potenziale di formazione delle colonie, comparato al clone controllo (Fig. 1D). Abbiamo inoltre confermato che i livelli di *GABRA6* and *MATH3* sono up-regolati nel clone 199bSC1 (Fig. 1F); *MATH3* è noto essere represso da *HES1* [35].

Il miR-199b-5p diminuisce la quota di cellule appartenenti alla side population nella linea cellulare Daoy e regola negativamente la popolazione di cellule staminali del MB.

Il pathway di Notch è stato collegato alla frazione di cellule tumorali di MB che esprimono i

marcatori delle cellule staminali [36]. La side population (SP) delle cellule tumorali ha un ruolo importante nella crescita tumorale in modelli xenograft murini [37]. Abbiamo analizzato l'influenza del miR-199b-5p sulla popolazione di cellule tumorali che escludono il colorante Hoechst 33342, una strategia per identificare la SP. La SP della linea cellulare Daoy, analizzata tramite citometria a flusso, mostra un 4.9% di cellule SP+, confrontate con il controllo negativo di cellule trattate con verapamil (Fig. 11A, B). Il trattamento con verapamil è basato sull'inibizione di una pompa ionica responsabile dell'esclusione dell'Hoechst 33342, che rende impossibile vedere la SP cells [38]. La side population risulta, invece, assente nei cloni 199bSC1 e 199bMC1 (Fig. 11C-F).

Le cellule staminali del sistema nervoso centrale esprimono l'antigene CD133 e sono le uniche capaci di formare tumori nei topi nudi atimici [18,39]. Il pathway di Notch ha un ruolo chiave nei processi di auto-rinnovamento, l'inibizione di questo pathway diminuisce la quota di cellule CD133+ nella linea cellulare Daoy attraverso l'induzione dell'apoptosi nelle cellule progenitrici [36]. Recentemente, è stato dimostrato che le cellule Cd133+ della linea cellulare Daoy promuovono la crescita tumorale nel fianco di topi nudi, al contrario delle cellule Cd133- [40]. Per questo motivo abbiamo valutato la percentuale di cellule Cd133+ della linea cellulare Daoy rispetto ai cloni 199bSC1 e 199bMC1 (Fig. 2). Le cellule Daoy hanno una quota del 14.8% di CD133+, mentre negli stabili

199bSC1 e 199bMC1 la quota di cellule CD133+ sono del 2.4% e 6.5%, rispettivamente (Fig. 2C-F). Questi dati dimostrano che il miR-199b-5p ha un ruolo nella regolazione negativa della frazione di cellule staminali tumorali.

L'overespressione di HES1 reverte il fenotipo del clone overesprimente il miR-199b-5p

Per confermare che il fenotipo visto nei cloni stabili per il miR-199b-5p fosse direttamente correlato alla diminuzione di espressione di HES1, abbiamo effettuato esperimenti di reversione del fenotipo nel clone 199bSC1. Il cDNA di HES1 è stato clonato e trasfettato nel clone stabile 199bSC1, ed è stata valutata l'espressione di HES1 tramite immunoblotting (Fig. 3A). Inoltre, è stata valutata la ri-espressione di cyclin D1, che era diminuita nel clone stabile 199bSC1. La ri-espressione di HES1 reverte anche l'effetto del miR-199b-5p sulla proliferazione cellulare (Fig. 3B). Allo stesso tempo, la trasfezione di HES1 nello stabile 199bSC1 diminuisce l'espressione dei geni pro-neurali bHLHs e del differenziamento neuronale e aumenta i livelli dei geni della proliferazione (Fig. 3C), inoltre aumenta la percentuale di cellule in fase S del ciclo cellulare, rimuovendo il blocco in fase G0-G1 (Fig. 3D). Per quanto riguarda la side population, la ri-espressione di HES1 aumenta di poco la SP dell' 1.3%, comunque più alta della percentuale di cellule SP+ presenti nel clone stabile 199bSC1 (Fig. 3E-H) e più bassa delle cellule presenti nelle cellule Daoy (Fig. 11). Questo

è probabilmente dovuto al breve tempo di ri-espressione di HES1 dopo la trasfezione in transiente. Poi abbiamo cercato di revertire il fenotipo visto per le cellule CD133+; la trasfezione in transiente non aumenta la percentuale di CD133+, forse per la breve ri-espressione di HES1 che non permette la riorganizzazione della gerarchia delle cellule Daoy.

La crescita tumorale è ridotta negli xenograft derivanti dal clone stabile 199bSC1.

I risultati ottenuti indicano che il miR-199b-5p è un potenziale inibitore della formazione tumorale. Per studiare il ruolo del miR-199b-5p in un modello tumorale, *in vivo*, abbiamo stabilizzato il clone 199bSC1 ed il clone di controllo con un vettore di espressione codificante per il gene della luciferasi. I cloni ottenuti sono stati testati per i livelli di espressione della luciferasi e per l'espressione di HES1 e del miR-199b-5p (Fig. 12A-D). I cloni stabili 199b-Luc1 e Ctl-Luc-4 Daoy sono stati poi iniettati rispettivamente, nel fianco destro e sinistro, di cinque topi nudi atimici. La crescita tumorale è stata valutata ogni settimana attraverso la bioluminescenza delle cellule iniettate. Dopo otto settimane tutti i topi hanno mostrato una massa tumorale visibile nel fianco di controllo, mentre soltanto tre fianchi iniettati con il clone 199b-Luc1 hanno mostrato una crescita tumorale comunque significativamente inferiore rispetto al controllo (Fig. 4A). La misura della bioluminescenza dimostra una significativa riduzione di emissione per il fianco iniettato con il

miR-199b-5p durante la crescita tumorale rispetto al fianco di controllo (per esempio topo #4, Fig. 4B). Dopo nove settimane, quattro dei cinque topi hanno mostrato differenze statisticamente significative nei segnali di bioluminescenza tra fianco di controllo e fianco miR-199b-5p (Fig. 4C). I dati dimostrano che il miR-199b-5p può inficiare la formazione tumorale *in vivo* in topi nudi atimici. Il tumore xenograft del topo #5 e del topo #4 sono stati espantati e analizzati per l'espressione del miR-199b-5p e di HES1 e valutati istologicamente (Fig. 12E-H).

Per studiare ulteriormente l'abilità del miR-199b-5p di regolare la crescita del MB, abbiamo iniettato il clone stabile 199bSC1 nel quarto ventricolo di topi nudi atimici di cinque settimane di età (Fig. 4D, E). Dopo quattro settimane di crescita tumorale, seguita tramite la bioluminescenza, nei topi iniettati con il clone stabile 199bSC1 è stata molto minore rispetto ai topi iniettati con il controllo. Come ulteriore conferma, abbiamo iniettato nel quarto ventricolo di topi atimici cellule infettate con un adenovirus codificante per il miR-199b-5p; come per i precedenti esperimenti questi topi mostrano una riduzione di bioluminescenza dopo quattro settimane (Fig. 4F). Le immagini delle acquisizioni della bioluminescenza dopo otto settimane sono mostrate in figura 4G. Due di questi topi sono stati sacrificati e analizzati con tecniche istologiche. La colorazione ematossilina-eosina del tessuto cerebellare, espantato dai topi, mostra la presenza della massa tumorale nel cervelletto

del topo AdV5-Mock#2 e del topo AdV5-199b#3. Sezioni istologiche parallele sono state esaminate al microscopio a fluorescenza per valutare l'espressione della proteina verde fluorescente (GFP) espressa dalle cellule infettate con l'adenovirus. Poi abbiamo valutato l'espressione di HES1, Ki67, Gabra6, Nestin e Math-3 (Fig. 4G-H e 12L-M). Altri due topi (AdV5-Mock#7; AdV5-199b#5) sono stati analizzati con la tecnologia PET-CT dopo 12 settimane dall'iniezione per valutare la proliferazione (Fig. 5A, B). Dati supplementari di acquisizione di bioluminescenza con due video mostrano la ricostruzione 3D del topo iniettato con AdV5-Mock e del topo AdV5-199b (Fig. 14). Questi dati dimostrano una significativa riduzione della massa tumorale nel topo AdV5-199b#5, in confronto con il topo AdV5-Mock#7, inoltre, l'analisi PET-CT mostra la riduzione della massa (0.024 cm^3 versus 0.044 cm^3 , rispettivamente). I dati mostrati indicano un chiaro effetto benefico della overespressione del miR199b-5p, che regola negativamente la crescita tumorale delle cellule di MB nel modello murino ortotopico xenograft.

Espressione del miR-199b-5p nei medulloblastoma umani.

Abbiamo analizzato l'espressione del miR-199b-5p in 13 cervelletti di controllo pediatrici ottenuti dalla banca NICHD Brain and Tissue Bank for Developmental Disorders, dell'Università del Maryland, USA. Abbiamo comparato l'espressione del miR-199b-5p in 5 cervelletti tra 0-1 anni e 6 tra 13-16 anni (Fig. 6A).

Il miR-199b-5p ha una elevata espressione nei cervelletti di controllo più giovani 0-1 anni di età (Mann-Whitney test, $P = 0.006$).

L'espressione del miR-199b-5p è stata valutata in 61 MB. L'intera popolazione ($n = 61$) è stata divisa in due gruppi, bassa versus alta espressione del miR-199b-5p, divisione basata sulla mediana. L'espressione del miR-199b-5p nei casi non metastatici (M0) e metastatici (M1, M2 e M3) mostra che l'espressione del miR-199b-5p nei casi non metastatici è molto più alta che nei casi metastatici ($P = 0.001$, Pearson Chi-Square test; Fig. 6B).

L'espressione del miR199b-5p è stata valutata in una coorte di pazienti formata da 108 campioni, i valori di espressione ($2^{-\Delta C_t}$) sono stati normalizzati e i pazienti sono stati suddivisi in tre gruppi in accordo al 33° and 66° percentile di espressione del miR199b-5p. I tre gruppi sono stati identificati come basso, medio ed alto e la loro storia clinica è stata correlata all'espressione del miR 199b. Per 90 dei 108 casi di cui abbiamo avuto i dati di follow-up, 31 erano definiti alti, 29 bassi e 30 medi. L'analisi Kaplan-Meier (SPSS software package) nei 90 pazienti mostra un sotto gruppo in cui l'alta espressione è correlata con un tempo più lungo di sviluppo di recidive comparato al gruppo con bassa espressione. Sfortunatamente, il test log-rank rileva che questo trend non è significativo (Figura 7). Se invece correliamo soltanto i due gruppi con bassa ed alta espressione (Kaplan-Meier in Figura 8) il test log-rank è significativo, dimostrando che i

tempi di sopravvivenza senza recidiva sono molto differenti tra i due gruppi, con il sotto gruppo ad alta espressione che sopravvive di più rispetto al gruppo con bassa espressione del mir199b-5p.

I risultati ottenuti dimostrano che l'espressione del miR-199b-5p è diminuita nei casi di MB metastatici indicando un meccanismo di regolazione epigenetica. Abbiamo poi valutato l'espressione del miR-199b-5p in un pannello di cellule di MB dopo trattamento con un agente demetilante 5-aza-deoxycytidine (Fig. 6D). Due linee cellulari (Med8a and UW228) mostrano una significativa up regolazione del miR-199b-5p, supportando l'ipotesi del controllo epigenetico dell'espressione del miR-199b-5p. Sono in corso studi ulteriori per dimostrare questa ipotesi.

Informazioni di supporto

Attraverso le analisi predittive dei target, si considera che miR-199a-5p e miR-199b-5p abbiano potenzialmente come bersaglio HES1. Per determinare se questo potenziale di legame si traduce in un'efficiente regolazione cellulare di HES1, abbiamo trasfettato sia miRNAs in cellule HEK-293 (Fig. 9 A, B). Abbiamo clonato il pre-miRNAs in due costrutti in cui l'espressione è stata ottenuta dal promotore CMV. Dopo 48 ore di trasfezione transiente, Mir-199b-5p ha down-regolato l'espressione di HES1. In questa fase, si potrebbe escludere effetti di miR-199a-5p su HES1 3'UTR in diversi tipi cellulari.

Abbiamo poi valutato i livelli di espressione del mir-199b-5p maturo utilizzando un approccio real-time

(vedi Procedure Sperimentali) in cellule Daoy e D283MED (Fig. 9C). MiR-199b-5p mostra bassi livelli di espressione in cellule SH-SY5Y, una linea cellulare di neuroblastoma, mentre le cellule Daoy esprimono più mir-199b-5p. Ci sono anche differenze nel livello di espressione dei due miRNA nella linea cellulare D283MED MB, che derivano dal liquido ascitico di un paziente metastatico di MB, rispetto alla linea cellulare Daoy [56]. L'espressione di Mir-199b-5p era 104 volte inferiore rispetto alle cellule Daoy, che riflettono potenzialmente i diversi tipi cellulari di origine tumorale[57]. L'espressione di miR-199a* è stato anche valutato (dati non mostrati), che è conosciuto anche come miR-199a-3p, e che recentemente è stato collegato al proto-oncogene MET [58]. Dopo l'over-espressione di pre-miR-199a, non abbiamo visto l'over-espressione di miR-199a* in Daoy. Ciò è probabilmente dovuto da un determinato trattamento di pre-miR-199b-5p verso la produzione di mir-199a (dati non mostrati). L'espressione di MiR-199b-5p è stata valutata anche in condizioni normali di tessuti umani (Fig.S1D): la sua espressione è molto elevata nel duodeno e nei linfonodi, con un'espressione più bassa nel cervello adulto (intero) e nella corteccia cerebrale.

Per confermare gli effetti di miR-199b-5p su diverse linee cellulari di MB, abbiamo trasfettato in maniera transiente le D283MED ed abbiamo valutato la down-regolazione della HES1 da Western blotting. Come mostrato nella figura di supporto 9 G, l'over-

espressione di miR-199b-5p ha portato ad una diminuzione dei livelli della proteina HES1. Questo effetto sulla proteina HES1 si traduce in una riduzione della proliferazione delle cellule, come valutato da MTS assay (vedi fig 10 F). In questo caso, abbiamo comparato le linee cellulari D283MED e ONS76 transfettate in maniera transiente con miR-199b-5p; in entrambi i casi abbiamo visto una diminuzione della proliferazione, rispetto ai campioni di cellule trasfettate col mock.

A questo punto ci siamo chiesti se miR-199b-5p è coinvolto nel controllo della proliferazione cellulare a livello endogeno. Per rispondere a questo quesito, abbiamo utilizzato un 2'-O-metil-oligoribonucleotide diretto contro la sequenza matura del miR-199b-5p (199b-OM), per diminuire i suoi livelli endogeni. Le cellule Daoy hanno mostrato la più alta quantità di miR-199b-5p tra le linee cellulari testate di MB (dati non mostrati), esse sono state trasfettate con 199b-OM (Fig. 10 G). Le cellule hanno mostrato un più alto tasso di proliferazione in vitro, rispetto al tasso di proliferazione delle cellule Daoy trasfettate con un controllo OM (oligonucleotide 2'-O-metil oligoribonucleotide).

Espressione di Mmu-miR-199b-5p nello sviluppo del cervelletto

Per affrontare la questione di come si esprime mir199 nel cervelletto durante lo sviluppo, abbiamo fatto uso dell'omologo murino mmu-miR-199b-5p e analizzati per la sua espressione nel cervelletto in

via di sviluppo del topo. Abbiamo applicato la metodologia sviluppata per l'uso di sonde di acido nucleico bloccate e classificate con digoxigenin (DIG). Embrioni di topo alla 14.5 settimana (E14.5) e cervello di topo neonato a P0 sono stati utilizzati in esperimenti nell'ibridazione in situ, come mostrato in figura 10A. L'espressione di mmu-miR-199b-5p è stato confrontato con quello di miR-124a come controllo, che è noto per essere uno miRNA abbondante nel sistema nervoso centrale. L'espressione di mmu-miR-199b-5p è più diffusa, rispetto a miR-124a. Inoltre, l'espressione di mmu-miR-199b-5p diminuisce con lo sviluppo del cervelletto, mentre miR-124a conserva la sua espressione nello strato di cellule granulari interne (Igl) e nei neuroni del Purkinje. Quindi, l'espressione del mmu-miR-199b-5p è stato valutato nel cervelletto del topo in diverse fasi di sviluppo, misurando i livelli di miRNA maturo e attraverso l'analisi di espressione mediante analisi di PCR real-time. I dati hanno mostrato che, anche se l'espressione di mmu-miR-199b-5p ha livelli inferiori rispetto a miR-124a, l'espressione di mmu-miR-199b-5p è regolata durante lo sviluppo, riducendosi dal 16.5 giorno embrionale fino allo sviluppo del cervelletto del topo adulto (fig. 10 B).

Regolazione del MiR-199b-5p di altri potenziali bersagli.

Tra gli obiettivi previsti di MiR-199b-5p, vi è la chinasi GSK3- β una proteina coinvolta nel segnale di trasduzione dal pathway di Shh a quello di Wnt, e

quindi una chinasi cruciale nella regolazione dei pathways nell'omeostasi delle cellule cerebrali. Per questa ragione, noi abbiamo valutato l'abilità di miR-199b-5p a down-regolare GSK3- β utilizzando il clone stabile 199bSC1. Questo clone non ha mostrato alcuna significativa riduzione dei livelli della proteina GSK3- β (Fig. 10 C). Questo effetto può essere spiegato dal fatto che non è accessibile il legame del 3'UTR di GSK3- β con miR-199b-5p, come è suggerito dall'alto $\Delta\Delta G$ valutato con l'algoritmo Pita (vedere tabella di supporto 3 che riporta la lista dei geni targets del MiR-199b-5p correlati al cancro; [59]).

TABELLA 3

Geni target	Funzione del gene (acronimo)	Analisi Miranda		Analisi PITA	
		Score	P-value	Seed	$\Delta\Delta G$
HES1	Transcription factor	18.2355	5.80E-03	8:0:1	-8.92
NTRK1	Neurotrophic tyrosine kinase receptor	19.4586	1.70E-03	8:0:1	1.21
CCNL1	Clyclin L1	17.4364	3.60E-05	8:0:0	-10.28
CDK9	Cyclin-dependent kinase 9	16.488	1.40E-04	8:0:0	-5.03
HIRA	HIR histone cell cycle regulation defective homolog A	16.224	2.10E-04	8:0:1	-2.52
HOXC5	Homeobox protein Hox-C5	16.157	8.21E-03	8:0:1	0.09

MAP2K5	Dual specificity mitogen- activated protein kinase kinase 5	16.2892	4.35E-02	8:0:1	-4.13
MAP3K12	Mitogen- activated protein kinase kinase kinase 12	15.8078	6.10E-03	8:0:1	-6.37
NANOG	Homeobox protein NANOG	17.3329	0.01486	8:0:1	-7.65
NHLH2	Helix-loop- helix protein 2 (HEN2)	16.0155	4.62E-03	8:0:0	-7.59
OTX1	Homeobox protein OTX1	16.1851	2.04E-04	8:0:1	-8.68
GSK3B	Glycogen synthase kinase-3 beta	16.4041	3.80E-02	8:0:0	0.03

Abbiamo selezionato anche altri tre geni per testare il potenziale di regolazione da parte di miR-199b-5p: Nanog, NHLH2 e cyclin L1. Quando down-regolati, questi geni potrebbero portare ad un fenotipo simile a quello visto nel clone stabile mir-199b-5p. Noi non abbiamo rilevato alcun effetto di down-regolazione di miR-199b-5p sui 3'UTRs questi geni selezionati (vedi Figura 10 D). Recentemente, è stato dimostrato che miR-199a* regola il proto-oncogene MET [57]. Dal momento che condivide la stessa sequenza di miR-199b-5p, sarà interessante verificare i livelli di questo proto-oncogene nelle nostre analisi, che sarà una questione di studi futuri.

Studi in vivo di cellule Daoy bioluminescenti over-esprimenti il miR-199b-5p.

Le immagini in-vivo basate sulla Luciferasi sono

emerse recentemente come un potente strumento per indagare il potenziale di innesto ortotopico delle cellule tumorali in modelli animali [60]. Per determinare il ruolo di miR-199b-5p in un modello in vivo di tumore, abbiamo stabilizzato i cloni di 199bSC1 ed il controllo con un vettore di espressione avente cDNA di luciferasi. I cloni sono stati testati per valutare i livelli di espressione della luciferasi (fig.12 A, B): questi esperimenti in vitro hanno dimostrato elevata correlazione tra il numero di cellule e bioluminescenza misurata. Pertanto, l'espressione di luciferasi consente di avere immagini non invasive di tumori e la quantificazione della crescita tumorale. I cloni stabili ottenuti sono stati convalidati per il loro mantenimento del fenotipo parentale, sia per l'espressione di miR-199b-5p che di HES1, come illustrato nella figura di Supporto 12 C, D. Lo xenotrapianto dal topo # 4 è stato trattato al fine di determinare la morfologia, usando colorazione ematossilina-eosina. I tumori formati sul lato controllo sono più invasivi ed aggressivi rispetto a quelli formati sul lato iniettato con miR-199b-5p, come si può vedere l'invasione delle cellule tumorali nel tessuto muscolare (Fig. 12 E; frecce in nero) . La colorazione con un anticorpo diretto contro Nestin ha rivelato che il tumore formato sul lato con miR-199b-5p mostra meno cellule con la caratteristica di progenitori neurali, in accordo con la down-regolazione del pathway di Notch (Fig. 12 G, H) [61]. L'espianto dal topo #5, che forma i tumori sia sul lato iniettato

col 199b che su quello controllo, ha mostrato una perdita di espressione del transgene (miR-199b-5p), il quale potrebbe essere responsabile per il recupero del potenziale di tumore (fig. 12 I).

Per caratterizzare ulteriormente la capacità di miR-199b-5p di contrastare la crescita tumorale in vivo, abbiamo stabilito impianti ortotopici di cellule Ctrl-Luc1 e 199b-Luc4. Inoltre, abbiamo iniettato anche cellule Daoy wild-type che sono state precedentemente infettate da un adenovirus ricombinante esprimente miR-199b-5p (AdV5-199b), seguite con immagini in vivo di bioluminescenza (BLI). Abbiamo usato come controllo sia 199b-Luc1, che il clone Ctrl-Luc4 infettate con un virus AdV5-mock. I risultati a 4 settimane dall'iniezione sono mostrati in Fig. 4F, con più analisi di BLI dei topi mostrati alla 4° e 8° settimana (Fig. 4G e 14).

La linea cellulare Daoy trattata con DAPT mostra maggiore espressione endogena di miR-199b e l'espressione di geni come nelle cellule staminali embrionali.

Per determinare se si può aumentare i livelli endogeni di miR-199b-5p, abbiamo trattato linee cellulari Daoy con N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-l-alanyl]-S-phenylglycine t-butylester (DAPT, Sigma-Aldrich), che blocca in modo efficace il complesso presenilina-secretasi e, di conseguenza, previene efficientemente l'attivazione di Notch [62,63]. Come mostrato in Fig. 13 A, abbiamo riscontrato che al momento del trattamento con DAPT, il livello di mirR-

199b-5p è aumentato di 9 volte a 12 h. Questa attivazione è poi seguita da una rapida inibizione della sua espressione, entro le 24 h di trattamento. Questi dati sono poi stati supportati dalla verifica dei livelli di HES1 utilizzando come analisi il Western Blot (Fig. 13 B), indicando così che, in seguito all'overespressione di miR-199b-5p, è stata osservata l'inibizione della proteina HES1. Questi dati ci hanno indotto a stabilire in che misura l'over-espressione di miR199 e la perdita di HES1 possono influenzare l'espressione dei geni coinvolti nelle cellule staminali embrionali (ES) e nelle cellule staminali tumorali sottoposte al trattamento con DAPT.

In seguito ai risultati presentati in un recente studio [64], abbiamo analizzato il profilo di espressione dei geni con real-time quantitativa (Top-8 list) che sono associati all'identità delle cellule staminali embrionali (ES), e alla proprietà di "staminalità" di diversi tumori solidi, tra cui tumore al seno, alla vescica e glioma. Qui, abbiamo selezionato i marcatori per i geni delle cellule staminali (MB e glioblastoma), come CD133 e c-myc, e quindi i geni che sono la chiave di regolazione dell'identità delle cellule ES: Oct4, KLF5 e Nanog. Abbiamo anche analizzato i geni associati con cellule staminali adulte / funzione progenitrice, ES e proliferazione delle cellule tumorali e / o la progressione del cancro. Secondo questi criteri, l'elenco di geni comprende: CD133, c-myc, Oct4, KLF5, Nanog, TCF7L1, HMGA1, HMGB3, ZIC1, MYBL2, TEAD4 e ILF3.

Come mostrato in Figura 13 C, l'espressione del CD133 e c-myc sono geni down regolati nelle Daoy indotta con DAPT. Quindi, l'espressione genica dei livelli di Oct4, Nanog, KFL5, TCF7L1, HMGA1, HMGB3, ZIC1, MYBL2 e TEAD4 è stata down-regolata, in Daoy DAPT, dall'over-espressione di miR-199b-5p, primers e valori di $2^{-\Delta CT}$ sono elencati nella scheda S3. Questo conferma quindi che up-regolazione di miR-199b-5p è concomitante con l'inibizione del pathway di Notch, che regola le cellule staminali, come si è visto da questi marcatori selezionati già noti per essere coinvolti 'direttamente' o 'indirettamente' in questo fenomeno. Allo stato attuale, resta da stabilire in quale misura l'over-espressione di miR-199b-5p può essere modulata dall'inibizione del pathway di Notch. Queste domande sono rivolte a studi futuri.

Ulteriori studi hanno dimostrato l'over-espressione dei geni PDGFR-A, PDGFR-B e SPARC in pazienti metastatici MB e in linee cellulari di MB [65,66]. Abbiamo, quindi, anche analizzato l'espressione di PDGFR-A, PDGFR-B e SPARC nel modello cellulare Daoy, come illustrato in precedenza, con la sua up-regolazione endogena di miR199b attraverso il trattamento con DAPT. Come mostrato in Figura 13D, l'espressione di PDGFR-B e SPARC è down regolata nelle Daoy trattate con DAPT, mentre abbiamo visto un lieve up-regolazione di PDGFR-A. In questo momento, resta da stabilire se questo scarso aumento dell'espressione di PDGFR-A attraverso il pathway di RAS / MAPK è sufficiente a indirizzare il potenziale metastatico

delle cellule di MB overesprimenti miR-199b-5p; questo è un effetto opposto a quello che abbiamo ottenuto con l'espressione di miR199b-5p nei tumori. Inoltre, questi risultati sono in qualche modo in contraddizione con i dati presenti in letteratura [66], l'over-espressione di PDGFR-A trovata nei tumori metastatici di MB non può essere giudicata a causa di una non corretta annotazione della sequenza e del probe da parte di GenBank e Affymetrix: sebbene la sequenza di GenBank J03278 comprende la regione codificante completa di PDGFR-B, il locus è stato dato come 'PDGFRA', e il probe Affymetrix 1771 è stato annotato come 'J03278 HUMPDGFRA Human platelet-derived growth factor (PDGF) receptor mRNA'. All'interno di questi nuovi dati, PDGFR-B è stato visto up-regolato in tumori metastatici di MB. Questi ultimi risultati sono in linea con quello che abbiamo visto nelle nostre cellule Daoy, dove l'overespressione di miR-199b-5p con il trattamento di DAPT induce down-regolazione dell'espressione di PDGFR-B e SPARC. Ciò, a sua volta è correlato con la perdita di espressione di miR199b-5p in pazienti metastatici, e definitivamente rafforza l'importanza dell'espressione di miR-199b-5p e il suo coinvolgimento nel sviluppo del cancro di MB, ostacolando il loro potenziale metastatico. Infine, i dati qui presentati hanno confermato il ruolo di overespressione di miR-199b-5p collegando la sua funzione principale di inibizione di cellule staminali embrionali e cellule staminali tumorali sia gestita da geni già coinvolti in questi meccanismi di azione.

Recentemente, un particolare pattern di espressione da pazienti bambini di MB ha mostrato nove miRNAs, che comprendeva miR-199b-5p, clusterizzare con tumori overesprimanti ErbB2 e/o di c-Myc[67]. In particolare, hanno mostrato una più alta espressione di miR-135a e b, miR-10b, miR-125b, miR-153, e miR-199b-5p in pazienti positivi a ErbB2. Nel complesso, i risultati dalla letteratura rafforzano ulteriormente l'importanza di miR-199b-5p e la sua espressione upregolata in tumori MB [67]. Dall'articolo Gilbertson et al. [68] è stato dimostrato che tumori positivi ErbB2-HER4 si comportano come marker prognostici indipendente nei bambini con MB, ed in particolare Erb-2 è un marcatore prognostico peggiore dato il suo effetto negativo sulla sopravvivenza in MB. Ferretti et al. [67] dimostra che l'iperespressione di miR-199b-5p è stato verificato in 12 casi su 33 tumori di MB analizzati, mentre nelle nostre analisi abbiamo trovato che una bassa espressione di miR-199b-5p è correlata al tumore di pazienti M+ (Fig.6 B). Ferretti et al. Associavano l'overespressione di miR-199b-5p all'aggressività della coorte con Erb-2-positivo utilizzando analisi di clustering. Riteniamo che questi dati sono diversi da i nostri risultati a causa delle differenti fonti di tumori e dalle diverse correlazioni statistiche (analisi di clustering gerarchico rispetto Pearson Chi-Square test). Riteniamo che la nostra analisi sia più precisa, perché il numero di campioni utilizzati e l'uso di tre fonti indipendenti di campioni di tumori, migliorino la potenza della nostra analisi statistica.

In sintesi, abbiamo utilizzato per la valutazione l'espressione di mir199b-5p una banca di tumori italiana, francese e canadese, per un totale di 45 campioni analizzati con tutte le informazioni di follow-up qui presentate (Tabella 2 supplementare).

DISCUSSIONE

Le connessioni tra i pathways di segnalazione alterati nel MB restano ancora ampiamente sconosciute ed è difficile stabilire la stratificazione dei pazienti per definire le classi di rischio. In questo studio è stato identificato un meccanismo di regolazione del gene HES1 attraverso il miR-199b-5p. HES1 è un regolatore chiave durante lo sviluppo del cervelletto, come indicato da recenti scoperte che dimostrano un aumento dei livelli di HES1 nelle cellule cerebellari granulari trattate con Shh, suggerendo che HES1 è un fattore trascrizionale implicato sia nei pathways di Shh che di Notch [20].

In questo studio, è stato riportato per la prima volta un nuovo meccanismo di regolazione del fattore di trascrizione HES1 guidato dal miR-199b-5p, che lega la 3'UTR di HES1 impedendone la traduzione. Da notare, è stata studiata anche l'azione del miR-199b-5p sulle regioni 3'UTR dei geni NHLH2, cyclin L1 e Nanog (Fig. 10D). Questi ultimi geni, tra tutti i targets predetti usando due diversi algoritmi (Tabella 3), erano putativi candidati perchè correlati al fenotipo osservato dopo l'overespressione del miR-199b. Non è stata ottenuta la diminuzione dell'attività luciferasica per questi geni nelle stesse condizioni

utilizzate per *HES1*. Inoltre, lo stabile 199bSC1, ha un livello di proteina GSK3- β comparabile al controllo, infatti comparando il valore di $\Delta\Delta G$ (algoritmo PITA) per GSK-3 β è molto alto indicando una bassa accessibilità alla 3'UTR di GSK3- β [41] (Table 3). Recentemente, è stato dimostrato che il miR-199a*, che ha la stessa sequenza del miR-199b-5p, è coinvolta nell'attivazione delle caspasi, tramite la regolazione del proto-oncogene *Met* [42]. Sarà interessante, in futuri lavori, studiare questo target.

L'analisi dei cloni stabili per il miR-199b-5p suggerisce che potrebbe inficiare la proliferazione delle cellule di MB. La perdita di espressione del gene *Cyclin D1* nei cloni del miR-199b-5p ricorda un fenotipo simile a quello visto nei topi *Ccnd1*^{-/-}, che hanno una diminuzione nella proliferazione dei precursori delle cellule granulari e atassia come conseguenza del mancato sviluppo delle funzioni cerebellari che influenzano lo sviluppo di lesioni pre-neoplastiche del MB [43].

I dati di questo studio sono in accordo con il fenotipo osservato nei topi knocked down per *HES1*.

La correlazione che abbiamo osservato tra espressione del miR-199b-5p e stadio metastatico M1 permette di identificare un sotto-gruppo di pazienti che svilupperanno un tumore aggressivo con formazione di metastasi che è il maggiore fattore indipendente associato alla bassa sopravvivenza. Nonostante, la correlazione allo stadio M1, la overespressione del miR-199b-5p non diminuisce la motilità cellulare della

linea Daoy (Fig. 10E). Di particolare interesse, è l'espressione dei geni PDGFR-B e SPARC, recentemente correlata con lo stadio metastatico nel MB [44,45], che sono down regolati nei cloni overesprimenti il miR-199b-5p (Fig. 13D).

Il coinvolgimento del pathway di Notch nello sviluppo del MB è ormai chiaro e la presenza di metastasi leptomengiali nei topi omozigoti non fa altro che riconfermare tale ipotesi [25,46].

Come mostrato in Fig. 6 e in tabella 2, i livelli di espressione del miR-199b-5p sono molto variabili, questo potrebbe essere dovuto ad alterazioni cromosomiche o al silenziamento epigenetico nei pazienti con prognosi negativa. La ragione per cui alcune linee cellulari non rispondono al trattamento con il farmaco demetilante potrebbe essere dovuto a perdita del gene stesso o ad una diversa regolazione del miR-199b che riflette la differente origine della linea cellulare.

L'interesse per riuscire a capire il meccanismo che fa acquisire proprietà uniche alle cellule staminali cancerose è crescente [47]. Recentemente, è stato dimostrato che le cellule CD133+ di glioblastoma hanno maggiori capacità di sopravvivere dopo essere state sottoposte a radiazioni ionizzanti, attraverso il riparo dei danni al DNA [48]. La linea cellulare Daoy esprime l'antigene CD133 ed è radioresistente, facendo supporre che siamo un modello per lo studio di questo compartimento di cellule staminali [49]. In questo studio, è stato dimostrato che il miR-199b-5p influenza

la side population e la popolazione CD133+ della linea Daoy, che sono le due sotto-popolazioni definite cellule staminali tumorali.

Insieme con CD133, sono stati valutati anche i livelli di espressione di geni nelle cellule staminali del cancro che hanno recentemente mostrato una correlazione con l'aggressività dei tumori solidi; Figura 13 (A-D) e tabella 1, l'espressione di questi geni è in accordo con una totale riduzione nel fenotipo 'staminale' delle cellule Daoy trattate con with N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-l-alanyl]-S-phenylglycine t-butylester (DAPT). Questo previene l'attivazione di Notch (Materiali), bloccando il complesso presenilina-secretasi e migliorando l'espressione di miR199b-5p [50,51]. Fino ad oggi, questa è la prima relazione dove l'espressione di un miRNA può ridurre il tumore a livello cellulare, indicando un interessante approccio terapeutico per il target di queste cellule nel tumore al cervello.

Da una serie di pubblicazioni vi è una forte indicazione che bambini con medulloblastoma al di sopra di 3 anni di età presentando maggiori benefici con la radioterapia, mentre resta una sfida il trattamento di bambini più giovani. L'assenza di differenze significative nel tasso di sopravvivenza tra i pazienti con escissione totale o parziale di MB supporta l'opinione che l'escissione totale di MB può essere evitata se il rischio di deficit neurologici potenziale è molto elevato. Recenti studi clinici hanno dimostrato un effetto benefico della chemioterapia, anche se

questo non è stato universalmente considerato [52,53]. Qui, si prevede l'uso di miR199b-5p in situ nel cervelletto di bambini colpiti da MB sotto i 3 anni di età (e positivo a HES1), in modo da compromettere il mantenimento del tumore avviato da cellule tumorali CD133+. In combinazione con la chemioterapia, e con la possibilità di abrogare la radioterapia ed evitare danni al cervello a causa di escissione totale del tumore, questo dovrebbe prevedere un miglioramento generale nell'attuale trattamento per MB. Così noi prevediamo la possibilità di trattare MB attraverso l'uso di particelle lipidiche con acido nucleico stabile incapsulato (SNALP). E' stato dimostrato essere efficace nei primati non umani per trasporto sistemico, che dovrebbe passare la barriera ematoencefalica utilizzando nanoparticelle incapsulate contenenti molecole di antagomir-199b-5p [54]. Come questi approcci di terapia genica potranno progredire è un problema per il futuro degli studi di pre-clinica sugli animali.

Come illustrato nel nostro modello (Fig. 6E), abbiamo immagini con due diversi livelli di espressione di miR-199b-5p in pazienti M0 e M+, che potrebbero essere causa di regolazione epigenetica durante cancerogenesi. Nel nostro modello con espressione di miR alta-moderata, con un aumento dell'espressione di miR-199b-5p reprime HES1, che poi porta ad un aumento dell'espressione del gene pro-neurale bHLHs, indirizzando le cellule verso il processo di differenziazione. Nel modello con espressione di miR

bassa-moderata a causa di meccanismi di controllo epigenetico, mentre HES1 è overespresso, indirizzando verso la proliferazione cellulare e l'induzione di SP e, di conseguenza, un aumento di cellule CD133+. Come per molti altri fattori di trascrizione, HES1 è un punto di integrazione tra le diverse vie di trasduzione del segnale, e il suo bilanciamento di espressione determina fondamentali decisioni per la cellula, se avviare o meno il programma di differenziazione. Con questo scenario, miR-199b-5p può essere visto come parte del complesso della via di trasduzione del segnale di Notch, come un raffinato sintonizzatore dei livelli di espressione del fattore di trascrizione HES1 un fattore di trascrizione appartenente alla famiglia bHLH. Questo fenomeno potrebbe essere considerato per verificare in differenti tessuti e tumori dove è coinvolta la via di Notch.

Bibliografia

1. Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 116: 281-297.
2. Hammond SM (2006) MicroRNAs as oncogenes. Curr Opin Genet Dev 16: 4-9.
3. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT (2005) c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. Nature 435: 839-843.
4. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, et al. (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at

- 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15524-15529.
5. Ciafre SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, et al. (2005) Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun* 334: 1351-1358.
6. Michael MZ, SM OC, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ (2003) Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 1: 882-891.
7. Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanesi N, et al. (2007) MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 15805-15810.
8. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA (2007) Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 449: 682-688.
9. Gilbertson RJ, Ellison DW (2008) The origins of medulloblastoma subtypes. *Annu Rev Pathol* 3: 341-365.
10. Buhren J, Christoph AH, Buslei R, Albrecht S, Wiestler OD, et al. (2000) Expression of the neurotrophin receptor p75NTR in medulloblastomas is correlated with distinct
25
histological and clinical features: evidence for a

- medulloblastoma subtype derived from the external granule cell layer. *J Neuropathol Exp Neurol* 59: 229-240.
11. Katsetos CD, Krishna L, Frankfurter A, Karkavelas G, Wolfe DE, et al. (1995) A cytomorphological scheme of differentiating neuronal phenotypes in cerebellar medulloblastomas based on immunolocalization of class III beta-tubulin isotype (beta III) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin. *Clin Neuropathol* 14: 72-81.
12. Marino S (2005) Medulloblastoma: developmental mechanisms out of control. *Trends Mol Med* 11: 17-22.
13. MacDonald TJ (2008) Aggressive infantile embryonal tumors. *J Child Neurol* 23: 1195-1204.
14. Yang SY, Wang KC, Cho BK, Kim YY, Lim SY, et al. (2005) Radiation-induced cerebellar glioblastoma at the site of a treated medulloblastoma: case report. *J Neurosurg* 102: 417-422.
15. Patrice SJ, Tarbell NJ, Goumnerova LC, Shrieve DC, Black PM, et al. (1995) Results of radiosurgery in the management of recurrent and residual medulloblastoma. *Pediatr Neurosurg* 22: 197-203.
16. Kombogiorgas D, Sgouros S, Walsh AR, Hockley AD, Stevens M, et al. (2007) Outcome of children with posterior fossa medulloblastoma: a

- single institution experience over the decade 1994-2003. *Childs Nerv Syst* 23: 399-405.
17. Huntly BJ, Gilliland DG (2005) Cancer biology: summing up cancer stem cells. *Nature* 435: 1169-1170.
18. Singh SK, Clarke ID, Hide T, Dirks PB (2004) Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* 23: 7267-7273.
19. Yang ZJ, Ellis T, Markant SL, Read TA, Kessler JD, et al. (2008) Medulloblastoma can be initiated by deletion of Patched in lineage-restricted progenitors or stem cells. *Cancer Cell* 14: 135-145.
20. Solecki DJ, Liu XL, Tomoda T, Fang Y, Hatten ME (2001) Activated Notch2 signaling inhibits differentiation of cerebellar granule neuron precursors by maintaining proliferation. *Neuron* 31: 557-568.
21. Ishibashi M, Moriyoshi K, Sasai Y, Shiota K, Nakanishi S, et al. (1994) Persistent expression of helix-loop-helix factor HES-1 prevents mammalian neural differentiation in the central nervous system. *Embo J* 13: 1799-1805.
22. Ishibashi M, Ang SL, Shiota K, Nakanishi S, Kageyama R, et al. (1995) Targeted disruption of mammalian hairy and Enhancer of split homolog-1 (HES-1) leads to upregulation of neural helix-loop-helix factors, premature neurogenesis, and severe

neural tube defects. *Genes Dev* 9: 3136-3148.

23. Nakamura Y, Sakakibara S, Miyata T, Ogawa M, Shimazaki T, et al. (2000) The bHLH gene *hes1* as a repressor of the neuronal commitment of CNS stem cells. *J Neurosci* 20: 283-293.

26

24. Fan X, Mikolaenko I, Elhassan I, Ni X, Wang Y, et al. (2004) *Notch1* and *notch2* have opposite effects on embryonal brain tumor growth. *Cancer Res* 64: 7787-7793.

25. Hallahan AR, Pritchard JI, Hansen S, Benson M, Stoeck J, et al. (2004) The *SmoA1* mouse model reveals that notch signaling is critical for the growth and survival of sonic hedgehog-induced medulloblastomas. *Cancer Res* 64: 7794-7800.

26. Leung C, Lingbeek M, Shakhova O, Liu J, Tanger E, et al. (2004) *Bmi1* is essential for cerebellar development and is overexpressed in human medulloblastomas. *Nature* 428: 337-341.

27. Griffiths-Jones S (2004) The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* 32: D109-111.

28. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, et al. (2006) Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 9: 189-198.

29. Sandberg AA (2002) Cytogenetics and molecular

- genetics of bladder cancer: a personal view. *Am J Med Genet* 115: 173-182.
30. Gramantieri L, Ferracin M, Fornari F, Veronese A, Sabbioni S, et al. (2007) Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 67: 6092-6099.
31. Jiang J, Gusev Y, Aderca I, Mettler TA, Nagorney DM, et al. (2008) Association of MicroRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival. *Clin Cancer Res* 14: 419-427.
32. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, et al. (2006) Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and nontumorous tissues. *Oncogene* 25: 2537-2545.
33. Izant JG, McIntosh JR (1980) Microtubule-associated proteins: a monoclonal antibody to MAP2 binds to differentiated neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 4741-4745.
34. Li XN, Parikh S, Shu Q, Jung HL, Chow CW, et al. (2004) Phenylbutyrate and phenylacetate induce differentiation and inhibit proliferation of human medulloblastoma cells. *Clin Cancer Res* 10: 1150-1159.
35. Hatakeyama J, Bessho Y, Katoh K, Ookawara S, Fujioka M, et al. (2004) Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of

neural stem cell differentiation. *Development* 131: 5539-5550.

36. Fan X, Matsui W, Khaki L, Stearns D, Chun J, et al. (2006) Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors. *Cancer Res* 66: 7445-7452.

37. Kondo T, Setoguchi T, Taga T (2004) Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 781-786.

27

38. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC (1996) Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* 183: 1797-1806.

39. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, et al. (2004) Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432: 396-401.

40. Eberhart CG (2007) In search of the medulloblast: neural stem cells and embryonal brain tumors. *Neurosurg Clin N Am* 18: 59-69, viii-ix.

41. Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, Gaul U, Segal E (2007) The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet* 39: 1278-1284.

42. Kim S, Lee UJ, Kim MN, Lee EJ, Kim JY, et al. (2008) MicroRNA miR-199a* regulates

- the MET proto-oncogene and the downstream extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2). *J Biol Chem* 283: 18158-18166.
43. Pogoriler J, Millen K, Utset M, Du W (2006) Loss of cyclin D1 impairs cerebellar development and suppresses medulloblastoma formation. *Development* 133: 3929-3937.
44. Gilbertson RJ, Clifford SC (2003) PDGFRB is overexpressed in metastatic medulloblastoma. *Nat Genet* 35: 197-198.
45. MacDonald TJ, Brown KM, LaFleur B, Peterson K, Lawlor C, et al. (2001) Expression profiling of medulloblastoma: PDGFRA and the RAS/MAPK pathway as therapeutic targets for metastatic disease. *Nat Genet* 29: 143-152.
46. Hatton BA, Villavicencio EH, Tsuchiya KD, Pritchard JI, Ditzler S, et al. (2008) The Smo/Smo model: hedgehog-induced medulloblastoma with 90% incidence and leptomeningeal spread. *Cancer Res* 68: 1768-1776.
47. Fan X, Eberhart CG (2008) Medulloblastoma stem cells. *J Clin Oncol* 26: 2821-2827.
48. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, et al. (2006) Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444: 756-760.
49. Blazek ER, Foutch JL, Maki G (2007) Daoy medulloblastoma cells that express CD133

are radioresistant relative to CD133⁻ cells, and the CD133⁺ sector is enlarged by

hypoxia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 67: 1-5.

50. Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, et al. (2008) An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors.

Nat Genet 40: 499-507.

51. Gao JX (2008) Cancer stem cells: the lessons from pre-cancerous stem cells. *J Cell Mol*

Med 12: 67-96.

52. Grill J, Dufour C, Kalifa C (2006) High-dose chemotherapy in children with newlydiagnosed medulloblastoma. *Lancet Oncol* 7: 787-789.

28

53. Grill J, Sainte-Rose C, Jouvét A, Gentet JC, Lejars O, et al. (2005) Treatment of medulloblastoma with postoperative chemotherapy alone: an SFOP prospective trial in young children. *Lancet Oncol* 6: 573-580.

54. Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, et al. (2006) RNAimediated gene silencing in non-human primates. *Nature* 441: 111-114.

55. Schabet M, Martos J, Buchholz R, Pietsch T. (1997) Animal model of human medulloblastoma: clinical, magnetic resonance imaging, and histopathological findings after intra-cisternal injection of MHH-MED-1 cells into nude rats. *Med*

Pediatr Oncol. 29:92-7.

Bibliografia dei materiali supplementari

56. Friedman HS, Burger PC, Bigner SH, Trojanowski JQ, Wikstrand CJ, et al. (1985) Establishment and characterization of the human medulloblastoma cell line and transplantable xenograft D283 Med. J Neuropathol Exp Neurol 44: 592-605.
57. Jacobsen PF, Jenkyn DJ, Papadimitriou JM (1985) Establishment of a human medulloblastoma cell line and its heterotransplantation into nude mice. J Neuropathol Exp Neurol 44: 472-485.
58. Kim S, Lee UJ, Kim MN, Lee EJ, Kim JY, et al. (2008) MicroRNA miR-199a* regulates the MET proto-oncogene and the downstream extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2). J Biol Chem 283: 18158-18166.
59. Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, Gaul U, Segal E (2007) The role of site accessibility in microRNA target recognition. Nat Genet 39: 1278-1284.
60. Rubin JB, Kung AL, Klein RS, Chan JA, Sun Y, et al. (2003) A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 13513-13518.
61. Fan X, Matsui W, Khaki L, Stearns D, Chun J, et al. (2006) Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors. Cancer Res 66: 7445-7452.
62. Dovey HF, John V, Anderson JP, Chen LZ, de Saint Andrieu P, et al. (2001) Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide

- levels in brain. *J Neurochem* 76: 173-181.
63. Geling A, Steiner H, Willem M, Bally-Cuif L, Haass C (2002) A gamma-secretase inhibitor blocks Notch signaling in vivo and causes a severe neurogenic phenotype in zebrafish. *EMBO Rep* 3: 688-694.
64. Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, et al. (2008) An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet* 40: 499-507.
65. MacDonald TJ, Brown KM, LaFleur B, Peterson K, Lawlor C, et al. (2001) Expression profiling of medulloblastoma: PDGFRA and the RAS/MAPK pathway as therapeutic targets for metastatic disease. *Nat Genet* 29: 143-152.
66. Gilbertson RJ, Clifford SC (2003) PDGFRB is overexpressed in metastatic medulloblastoma. *Nat Genet* 35: 197-198.
67. Ferretti E, De Smaele E, Po A, Di Marcotullio L, Tosi E, et al. (2008) MicroRNA profiling in human medulloblastoma. *Int J Cancer* 124: 568-577.
68. Gilbertson RJ, Pearson AD, Perry RH, Jaros E, Kelly PJ (1995) Prognostic significance of the c-erbB-2 oncogene product in childhood medulloblastoma. *Br J Cancer* 71: 473-477.
69. Giangaspero F, Wellek S, Masuoka J, Gessi M, Kleihues P, et al. (2006) Stratification of medulloblastoma on the basis of histopathological grading. *Acta Neuropathol* 112: 5-12.
70. Xi Chen et al., (2008) Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for

diagnosis of cancer and other diseases; Cell Research,
18:997-1006.

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

RIVENDICAZIONI

1) Sequenza oligonucleotidica comprendente la o consistente in:

CCAGAGGACACCT**CCACTCCGTCTACCCAG**TGTTTAGACTATCTGTTCAGGACTC
CCAAATTGTACAGTAGTCTGCACATTGGTTAGGCTGGGCTGGGTTAGACCCTCGG
(SEQ ID No: 1) per l'uso in campo medico.

2) Sequenza secondo la rivendicazione 1, veicolata mediante un vettore virale o mediante tecnologia SNALP, tecnologia LNA, o avente il gruppo O-2-Metile modificato mediante legame di una molecola di colesterolo tramite un linker C₁₋₇ .

3) Sequenza secondo la rivendicazione 2, in cui il vettore virale è un vettore adenovirale.

4) Sequenza secondo la rivendicazione 3, in cui il vettore adenovirale è un vettore Adv5 avente mappa mostrata in figura 16, detto vettore essendo costituito da 6217bp con un promotore CMV in cui è stato clonato nei siti XhoI/HindIII la sequenza secondo la rivendicazione 1

5) Composizione comprendente o consistente nella sequenza come definita in ognuna delle rivendicazioni 2-4 come principio attivo in associazione con uno o più eccipienti e/o coadiuvanti farmaceuticamente accettabili.

6) Uso della sequenza come definita in ognuna delle rivendicazioni 1-4, della composizione come definita nella rivendicazione 5 per la preparazione di un medicamento per la cura e/o la prevenzione dei tumori.

7) Uso secondo la rivendicazione 6, in cui i tumori sono scelti nel gruppo che consiste in medulloblastoma,

linfoma, glioblastomi, tumori del colon, del polmone, tumori alla mammella.

8) Uso della sequenza come definita nella rivendicazione 1 come marcatore dello stadio istopatologico del tumore e della presenza o meno di metastasi.

9) Metodo diagnostico *in vitro* per la valutazione dello stadio istopatologico del tumore e della presenza o meno di metastasi mediante rilevazione dell'espressione della sequenza come definita nella rivendicazione 1 in un campione biologico.

10) Metodo secondo la rivendicazione 9 in cui detta rilevazione avviene mediante PCR Real-time che impiega i seguenti primer di amplificazione:

primer Forward: CGGGAATTCCCAGAGGACACCTCCAC (SEQ ID NO:3)

primer Reverse: CGGCTCGAGCCGAGGGTCTAACCCAG (SEQ ID NO:4)

e una coppia di primer di controllo per la normalizzazione del valore di espressione della sequenza della rivendicazione 1.

11) Metodo secondo la rivendicazione 10 in cui i primer di controllo per la normalizzazione dell'espressione della sequenza della rivendicazione 1 sono i seguenti:

primer Forward: GAA AAG CCT TGT TTG TGC TTG C (SEQ ID NO: 5)

primer Reverse: GGG CCA TGC TAA TCT TCT CTG T (SEQ ID NO: 6)

12) Metodo secondo la rivendicazione 9 comprendente o consistente nelle seguenti fasi: a) retrotrascrizione

del RNA; e b) espressione della sequenza della rivendicazione 1 mediante saggio taqman che impiega i seguenti primer e sonda:

primer Forward: AGGACACCTCCACTCCGTCTAC (SEQ ID NO:7)

primer reverse: GCCTAACCAATGTGCAGACTACTG (SEQ ID NO:8)

sonda: CAGTGTTTAGACTATCTGTTTCAGGACTCCCAAATTG (SEQ ID NO:9)

13) Metodo secondo la rivendicazione 9 mediante TaqMan PCR real time che impiega i seguenti primer e sonda:

Primer Reverse CCCAGTGTTTAGACTATCTG (SEQ ID NO:10)

primer forward GAGACCCGCGGAAATC (SEQ ID NO:11)

sonda GCTCCCGCACCGCGGGTCTCGA (SEQ ID NO:12)

14) Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni da 9 a 13, che comprende ulteriormente la rilevazione dei seguenti geni espressi nelle cellule staminali tumorali scelti tra

CD133, c-myc, Nanog, Oct4, TCFL1, ZIC1, KLF5, HMGA1, HMGB3

15) Metodo secondo la rivendicazione 14, in cui i geni sono rilevati con PCR real time mediante amplificazione di almeno una delle seguenti sequenze:

CD133:

CTATGTGGTACAGCCGCGTGATTTCCCAGAAGATACTTTGAGAAAATTCTTACAG
AAGGCATATGAATCCAA AATTGATTA (SEQ ID NO: 13)

c-myc:

AGGAGGAACAAGAAGATGAGGAAGAAATCGATGTT (SEQ ID NO:14)

Nanog:

GCAAATGTCTTCTGCTGAGATGCCTCACACGGAGACTGTCTCTCCTCTTCCTTCC
TCCATGGATCTGCTTATTCAGGACAGC (SEQ ID NO:15)

Oct4:

- 97 -

ACTGCAGCAGATCAGCCACATCGCCCAGCAGCTTGGGCTCGAGAAGG

ATGTGGTCCGAGTGTGGTTCTGTAAACGGCGCCA (SEQ ID NO:16)

TCFL1:

CCGCGGGACTATTTGCGCGAAGTGAGAAGGCCTCAGGACAGCGCG TTCTTT

(SEQ ID NO:17)

ZIC1:

CAGTTCGCTGCGCAAACACATGAAGGTCCACGAATCCTCCTCGCAGGGCTC

(SEQ ID NO:18)

KLF5:

GCATCCACTACTGCGATTACCCTGGTTGCACAAAAGTTTATACCAAGTCTTCTCA

(SEQ ID NO:19)

HMGA1:

AAAAACAAGGGTGCTGCCAAGACCCGAAAACCACCACAACCTCCAGGAAGG

(SEQ ID NO:20)

HMGB3:

TTTTCCAAGAAGTGCTCTGAGAGGTGGAAGACGATGTCCGGGAAAGAGAAA

(SEQ ID NO:21);

impiegando le seguenti coppie di primer di
amplificazione:

CD133:

Primer Forward: CTATGTGGTACAGCCGCGTG (SEQ ID NO:22)

Primer Reverse: TAATCAATTTTGGATTCATATGCCTTC (SEQ ID
NO:23)

c-myc

primer Forward: ATGAGGAGACACCGCCAC (SEQ ID NO:24)

primer Reverse: AACATCGATTTCTTCCTCATCTTCTT (SEQ ID
NO:25)

Nanog:

primer Forward: GCAAATGTCTTCTGCTGAGATGC (SEQ ID NO:26)

primer Reverse: GCTGTCCTGAATAAGCAGATCCAT (SEQ ID NO:27)

Oct4:

primer Forward: ACTGCAGCAGATCAGCCACA (SEQ ID NO:28)

primer Reverse: TGGCGCCGGTTACAGAAC (SEQ ID NO:29)

TCFL1:

primer Forward: CCGCGGGACTATTTTCGC (SEQ ID NO:30)

primer Reverse: AAAGAACGCGCTGTCCTGAG (SEQ ID NO:31)

ZIC1:

primer Forward: CAGTTCGCTGCGCAAACA (SEQ ID NO:32)

primer Reverse: GAGCCCTGCGAGGAGGAT (SEQ ID NO:33)

KLF5:

primer Forward: GCATCCACTACTGCGATTACCC (SEQ ID NO:34)

primer Reverse: TGAGAAGACTTGGTATAAACTTTTGTGC (SEQ ID NO:35)

HMGA1:

primer Forward: AAAAACAAGGGTGCTGCCAA (SEQ ID NO:36)

primer Reverse: CCTTCCTGGAGTTGTGGTGGT (SEQ ID NO:37)

HMGB3:

primer Forward: TTTTCCAAGAAGTGCTCTGAGAGG (SEQ ID NO:38)

primer Reverse: TTTCTCTTTCCCGGACATCG (SEQ ID NO:39)

ed impiegando le seguenti coppie di primer per la normalizzazione dell'espressione delle sequenze geniche:

primer forward: CGT GCT GCT GAC CGA GG (SEQ ID NO:79)

primer reverse: GAA GGT CTC AAA CAT GAT CTG GGT (SEQ ID NO:80)

16) Metodo secondo la rivendicazione 9, in cui detti uno o più geni sono rilevati mediante real time TaqMan per amplificazione di almeno una delle seguenti sequenze:

cd133

- 99 -

TCCACAGAAATTTACCTACATT

GGAAGAGTATGATTTCATACTGGTGGCTGGGTGGCCTGGTCATCTGCTCTCTGCTG

ACCC (SEQ ID NO:40)

c myc

GCTGGATTTTTTTTCGGGTAGTGGAACCAGCAGCCT

CCGCGACGATGCCCCTCAACGTTAGCTTCACCAACAGGAACTA (SEQ ID NO:41)

nanog:

CCGAAGAATAGCAATGGTGTGACGCAG

AAGGCCTCAGCACCTACCTACCCAGCCTTTACTCTTCCTACCACCAGGGATG

(SEQ ID NO:42)

oct 4:

AACCCGGAGGAGGTAGTCCTTTGTTACATGCATGAGTCAGTGAACAGGGAATGGG

TGAATGACATTTGTGGGTAGGTTATT (SEQ ID NO:43)

tcfl1:

CCAAGGAAGAGAACGTTGACATAGAAGGCTCTTTGTGTTTTTCCTTGTCTTTTGT

CCTCAGACTTGATCCTGCTCCCTCGG (SEQ ID NO:44)

zic 1:

CGCGCTCCGAGAATTTAAAGATCCACAAAAGGACGCACACAGGGAGAAGCCCTTC

AAGTGCGAGTTTGAGGGCTGTGACC (SEQ ID NO:45)

KLF5:

TTTAACCCACCTCCATCCTATGCTGCTACAATTGCTTCTAAACTGGCAATTCAC

AATCCAAATTTACCCACCACCCTGCC (SEQ ID NO:46)

HMGA1:

CCCCAGGCAGACCTTATATGAGACATGGGAGTCCCACCGTATTGTCCAGGCTGGT

CTCGAACTCCTGACCTCAAGCA (SEQ ID NO:47)

HMGB3:

CGCTATGATCGGGAAATGAAGGATTATGGACCAGCTAAGGGAGGCAAGAAGAAGA

AGGATCCTAATGCTCCCAAAGGCCA (SEQ ID NO:48);

impiegando i seguenti primer e sonde di amplificazione:

cd133

primer Forward: TCCACAGAAATTTACCTACATTGGAA (SEQ ID NO:49)

primer Reverse: GGGTCAGCAGAGAGCAGATGA (SEQ ID NO:50)

sonda: AGTATGATTTCATACTGGTGGCTGGGTGGC (SEQ ID NO:51)

c myc:

primer forward :GCTGGATTTTTTTCGGGTAGTG (SEQ ID NO:52)

primer reverse: TAGTTCCTGTTGGTGAAGCTAACG (SEQ ID NO:53)

sonda CAGCAGCCTCCCGCGACG (SEQ ID NO:54)

nanog:

primer forward: CCGAAGAATAGCAATGGTGTGA (SEQ ID NO:55)

primer reverse: GCATCCCTGGTGGTAGGAAGA (SEQ ID NO:56)

sonda: CAGCACCTACCTACCCCAGCCTTTA (SEQ ID NO:57)

oct 4:

primer forward: AACCCGGAGGAGGTAGTCCTT (SEQ ID NO:58)

primer reverse: AATAACCTACCCACAAATGTCATTCA (SEQ ID NO:59)

sonda: CATGCATGAGTCAGTGAACAGGGAA (SEQ ID NO:60)

tcfl1:

primer forward: CCAAGGAAGAGAACGTTGACATAG (SEQ ID NO:61)

primer reverse: CCGAGGGAGCAGGATCAAG (SEQ ID NO:62)

sonda: AGGCTCTTTGTGTTTTTCCTTGTCTTTTGTCC (SEQ ID NO:63)

zic 1:

primer forward: CGCGCTCCGAGAATTTAAAG (SEQ ID NO:64)

primer reverse: CGGTCACAGCCCTCAAACCTC (SEQ ID NO:65)

sonda: TCCACAAAAGGACGCACACAGGG (SEQ ID NO:66)

KLF5:

Primer forward: TTTAACCCACCTCCATCCTATG (SEQ ID NO:67)

Primer reverse: GGCAGGGTGGTGGGTAAATT (SEQ ID NO:68)

Sonda: TGCTTCTAAACTGGCAATTCACAATC (SEQ ID NO:69)

HMGA1:

Primer forward: CCCCAGGCAGACCTTATATGAG (SEQ ID NO:70)

Primer reverse: TGCTTGAGGTCAGGAGTTCGA (SEQ ID NO:71)

Sonda: CATGGGAGTCCCACCGTATTGTCCA (SEQ ID NO:72)

HMGB3:

primer forward: CGCTATGATCGGGAAATGAAG (SEQ ID NO:73)

primer reverse: TGGCCTTTTGGGAGCATTAG (SEQ ID NO:74)

sonda: ATTATGGACCAGCTAAGGGAGGCAAG (SEQ ID NO:75)

ed impiegando le seguenti coppia di primer e sonda per la normalizzazione dell'espressione delle sequenze geniche:

primer Forward: GCCAACCGCGAGAAGATG (SEQ ID NO:81)

primer Reverse: ACAGCCTGGATAGCAACGTACA (SEQ ID NO:82)

sonda: CCCAATCATGTTTGAGACCTTCAAC (SEQ ID NO:83)

17) Kit diagnostico *in vitro* per la valutazione dello stadio istopatologico del tumore e della presenza di metastasi mediante rilevazione dell'espressione della sequenza come definita nella rivendicazione 1 in un campione biologico per PCR Real-time comprendente i o consistente nei seguenti primer di amplificazione:

primer Forward: CGGGAATTCCCAGAGGACACCTCCAC (SEQ ID NO:3)

primer Reverse: CGGCTCGAGCCGAGGGTCTAACCCAG (SEQ ID NO:4)

e una coppia di primer di controllo per la normalizzazione del valore di espressione della sequenza della rivendicazione 1.

18) Kit secondo la rivendicazione 17 in cui i primer di controllo per la normalizzazione dell'espressione della sequenza della rivendicazione 1 sono i seguenti:

primer Forward: GAA AAG CCT TGT TTG TGC TTG C (SEQ ID NO: 5)

primer Reverse: GGG CCA TGC TAA TCT TCT CTG T (SEQ ID NO: 6)

19) Kit diagnostico *in vitro* per la valutazione dello stadio istopatologico del tumore e della presenza di metastasi mediante rilevazione dell'espressione della sequenza come definita nella rivendicazione 1 in un campione biologico mediante saggio taqman comprendente i o consistente nei seguenti primer e sonda

primer Forward: AGGACACCTCCACTCCGTCTAC (SEQ ID NO:7)

primer reverse: GCCTAACCAATGTGCAGACTACTG (SEQ ID NO:8)

sonda: CAGTGTTTAGACTATCTGTTCAGGACTCCCAAATTG (SEQ ID NO:9)

20) Kit diagnostico *in vitro* per la valutazione dello stadio istopatologico del tumore e della presenza di metastasi mediante rilevazione dell'espressione della sequenza come definita nella rivendicazione 1 in un campione biologico mediante TaqMan PCR real time comprendente i o consistente nei seguenti primer e sonda:

Primer Reverse CCCAGTGTTTAGACTATCTG (SEQ ID NO:10)

primer forward GAGACCCGCGGAAATC (SEQ ID NO:11)

sonda GCTCCCGCACCGCGGGTCTCGA (SEQ ID NO:12)

21) Kit secondo ognuna delle rivendicazioni da 17 a 20 che comprende ulteriormente tutte le coppie di primer di amplificazione per la rilevazione dei geni marcatori di cellule staminali tumorali scelti tra CD133, c-myc, Nanog, Oct4, TCFL1, ZIC1, KLF5, HMGA1, HMGB3 mediante PCR real Time, assieme ad una coppia di primer per la

normalizzazione dell'espressione delle sequenze geniche; dette coppie di primer di amplificazione essendo le seguenti:

CD133:

Primer Forward: CTATGTGGTACAGCCGCGTG (SEQ ID NO:22)

Primer Reverse: TAATCAATTTTGGATTCATATGCCTTC (SEQ ID NO:23)

c-myc

primer Forward: ATGAGGAGACACCGCCAC (SEQ ID NO:24)

primer Reverse: AACATCGATTTCTTCCTCATCTTCTT (SEQ ID NO:25)

Nanog:

primer Forward: GCAAATGTCTTCTGCTGAGATGC (SEQ ID NO:26)

primer Reverse: GCTGTCCTGAATAAGCAGATCCAT (SEQ ID NO:27)

Oct4:

primer Forward: ACTGCAGCAGATCAGCCACA (SEQ ID NO:28)

primer Reverse: TGGCGCCGGTTACAGAAC (SEQ ID NO:29)

TCFL1:

primer Forward: CCGCGGGACTATTTCGC (SEQ ID NO:30)

primer Reverse: AAAGAACGCGCTGTCCTGAG (SEQ ID NO:31)

ZIC1:

primer Forward: CAGTTCGCTGCGCAAACA (SEQ ID NO:32)

primer Reverse: GAGCCCTGCGAGGAGGAT (SEQ ID NO:33)

KLF5:

primer Forward: GCATCCACTACTGCGATTACCC (SEQ ID NO:34)

primer Reverse: TGAGAAGACTTGGTATAAACTTTTGTGC (SEQ ID NO:35)

HMGA1:

primer Forward: AAAAACAAGGGTGCTGCCAA (SEQ ID NO:36)

primer Reverse: CCTTCCTGGAGTTGTGGTGGT (SEQ ID NO:37)

HMGB3:

primer Forward: TTTTCCAAGAAGTGCTCTGAGAGG (SEQ ID NO:38)

primer Reverse: TTTCTCTTTCCCGGACATCG (SEQ ID NO:39)

detta coppia di primer per la normalizzazione dell'espressione delle sequenze geniche essendo la seguente:

primer forward: CGT GCT GCT GAC CGA GG (SEQ ID NO:79)

primer reverse: GAA GGT CTC AAA CAT GAT CTG GGT (SEQ ID NO:80)

22) Kit secondo ognuna delle rivendicazioni da 17 a 20 che comprende ulteriormente una o più coppie di primer e reattive sonde per la rilevazione di uno o più geni di cellule staminali tumorali scelti tra CD133, c-myc, Nanog, Oct4, TCFL1, ZIC1, KLF5, HMGA1, HMGB3 mediante real Time TaqMan assieme ad una coppia di primer e una sonda per la normalizzazione dell'espressione delle sequenze geniche; dette coppie di primer e relative sonde si amplificano essendo le seguenti:

cd133

primer Forward: TCCACAGAAATTTACCTACATTGGAA (SEQ ID NO:49)

primer Reverse: GGGTCAGCAGAGAGCAGATGA (SEQ ID NO:50)

sonda: AGTATGATTCATACTGGTGGCTGGGTGGC (SEQ ID NO:51)

c myc:

primer forward :GCTGGATTTTTTTCGGGTAGTG (SEQ ID NO:52)

primer reverse: TAGTTCCTGTTGGTGAAGCTAACG (SEQ ID NO:53)

sonda CAGCAGCCTCCCGCGACG (SEQ ID NO:54)

nanog:

primer forward: CCGAAGAATAGCAATGGTGTGA (SEQ ID NO:55)

primer reverse: GCATCCCTGGTGGTAGGAAGA (SEQ ID NO:56)

- 105 -

sonda: CAGCACCTACCTACCCCAGCCTTTA (SEQ ID NO:57)

oct 4:

primer forward: AACCCGGAGGAGGTAGTCCTT (SEQ ID NO:58)

primer reverse: AATAACCTACCCACAAATGTCATTCA (SEQ ID NO:59)

sonda: CATGCATGAGTCAGTGAACAGGGAA (SEQ ID NO:60)

tcfl1:

primer forward: CCAAGGAAGAGAACGTTGACATAG (SEQ ID NO:61)

primer reverse: CCGAGGGAGCAGGATCAAG (SEQ ID NO:62)

sonda: AGGCTCTTTGTGTTTTTCCTTGTCTTTTGTCC (SEQ ID NO:63)

zic 1:

primer forward: CGCGCTCCGAGAATTTAAAG (SEQ ID NO:64)

primer reverse: CGGTCACAGCCCTCAAATC (SEQ ID NO:65)

sonda: TCCACAAAAGGACGCACACAGGG (SEQ ID NO:66)

KLF5:

Primer forward: TTAAACCCACCTCCATCCTATG (SEQ ID NO:67)

Primer reverse: GGCAGGGTGGTGGGTAAATT (SEQ ID NO:68)

Sonda: TGCTTCTAAACTGGCAATTCACAATC (SEQ ID NO:69)

HMGA1:

Primer forward: CCCCAGGCAGACCTTATATGAG (SEQ ID NO:70)

Primer reverse: TGCTTGAGGTCAGGAGTTCGA (SEQ ID NO:71)

Sonda: CATGGGAGTCCCACCGTATTGTCCA (SEQ ID NO:72)

HMGB3:

primer forward: CGCTATGATCGGGAAATGAAG (SEQ ID NO:73)

primer reverse: TGGCCTTTTGGGAGCATTAG (SEQ ID NO:74)

sonda: ATTATGGACCAGCTAAGGGAGGCAAG (SEQ ID NO:75)

 dette coppia di primer e sonda per la
normalizzazione dell'espressione delle sequenze geniche
essendo le seguenti:

primer Forward: GCCAACC GCGAGAAGATG (SEQ ID NO:81)

- 106 -

primer Reverse: ACAGCCTGGATAGCAACGTACA (SEQ ID NO:82)

sonda: CCCAATCATGTTTGAGACCTTCAAC (SEQ ID NO:83)

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

CLAIMS

1) Oligonucleotide sequence comprising or consisting in:

CCAGAGGACACCT**CCACTCCGTCTACCCAG**TGTTTAGACTATCTGTTCAGGACTC
CCAAATTGTACAGTAGTCTGCACATTGGTTAGGCTGGGCTGGGTTAGACCCTCGG
(SEQ ID No: 1) for use in medical field.

2) Sequence according to claim 1, delivered by means of a viral vector or SNALP technology, LNA technology, or having a modified O-2-Methyl group by linkage with a cholesterol molecule through a C₁₋₇ linker.

3) Sequence according to claim 2, wherein the viral vector is an adenoviral vector.

4) Sequence according to claim 3, wherein the adenoviral vector is an Adv5 vector having the map showed in figure 16, said vector being constituted by 6217bp with a CMV promoter in which the sequence of claim 1 has been cloned in XhoI/HindIII sites.

5) Composition comprising or consisting of the sequence as defined in anyone of the claims 2-4 as active principle in association with one or more excipients and/or coadjuvants pharmaceutically acceptable.

6) Use of the sequence as defined in anyone of the claims 1-4, of the composition as defined in claim 5 for the preparation of a medicament for the treatment and/or prevention of tumours.

7) Use according to claim 6, wherein the tumours are chosen from the group consisting of medulloblastoma, linfome, glioblastoma, tumours of colon, of lung, breast cancer.

8) Use of the sequence as defined in claim 1 as marker

of the histopathology phase of tumour and of the presence of metastasis.

9) *In vitro* diagnostic method for the evaluation of the histopathology phase of tumour and of the presence of metastasis by means of the detection of the expression of the sequence as defined in claim 1 in a biological sample.

10) Method according to claim 9, wherein said detection is carried out by PCR Real-time that uses the following amplification primers:

primer Forward: CGGGAATTCCCAGAGGACACCTCCAC (SEQ ID NO:3)

primer Reverse: CGGCTCGAGCCGAGGGTCTAACCCAG (SEQ ID NO:4)

and a control primer couple for the normalization of the expression value of the sequence of claim 1.

11) Method according to claim 10, wherein the control primers for the normalization of the expression value of the sequence of claim 1 are the following:

primer Forward: GAA AAG CCT TGT TTG TGC TTG C (SEQ ID NO: 5)

primer Reverse: GGG CCA TGC TAA TCT TCT CTG T (SEQ ID NO: 6)

12) Method according to claim 9 comprising or consisting of the following steps: a) retro-transcription of RNA; and b) expression of sequence of claim 1 by means of taqman assay that uses the following primers and probe:

primer Forward: AGGACACCTCCACTCCGTCTAC (SEQ ID NO:7)

primer reverse: GCCTAACCAATGTGCAGACTACTG (SEQ ID NO:8)

probe: CAGTGTTTAGACTATCTGTTTCAGGACTCCCAAATTG (SEQ ID NO:9)

13) Method according to claim 9 by means of TaqMan PCR real time that uses the following primers and probe:

Primer Reverse CCCAGTGTTTAGACTATCTG (SEQ ID NO:10)

primer forward GAGACCCGCGGAAATC (SEQ ID NO:11)

probe GCTCCCGCACCGCGGGTCTCGA (SEQ ID NO:12)

14) Method according to anyone of the claims from 9 to 13, that further comprises the detection of the following genes expressed in tumour stem cells chosen among: CD133, c-myc, Nanog, Oct4, TCFL1, ZIC1, KLF5, HMGA1, HMGB3

15) Method according to claim 14, wherein the genes are detected by means of PCR real time by amplification of at least one of the following sequences:

CD133:

CTATGTGGTACAGCCGCGTGATTTCAGAAAGATACTTTGAGAAAATTCTTACAG
AAGGCATATGAATCCAA AATTGATTA (SEQ ID NO: 13)

c-myc:

AGGAGGAACAAGAAGATGAGGAAGAAATCGATGTT (SEQ ID NO:14)

Nanog:

GCAAATGTCTTCTGCTGAGATGCCTCACACGGAGACTGTCTCTCCTCTTCCTTCC
TCCATGGATCTGCTTATTCAGGACAGC (SEQ ID NO:15)

Oct4:

ACTGCAGCAGATCAGCCACATCGCCAGCAGCTTGGGCTCGAGAAGG
ATGTGGTCCGAGTGTGGTTCTGTAACCGGCGCCA (SEQ ID NO:16)

TCFL1:

CCGCGGGACTATTTGCGCGAAGTGAGAAGGCCTCAGGACAGCGCG TTCTTT
(SEQ ID NO:17)

ZIC1:

CAGTTCGCTGCGCAAACACATGAAGGTCCACGAATCCTCCTCGCAGGGCTC

(SEQ ID NO:18)

KLF5:

GCATCCACTACTGCGATTACCCTGGTTGCACAAAAGTTTATACCAAGTCTTCTCA

(SEQ ID NO:19)

HMGA1:

AAAAACAAGGGTGCTGCCAAGACCCGAAAACCACCACAACCTCCAGGAAGG

(SEQ ID NO:20)

HMGB3:

TTTTCCAAGAAGTGCTCTGAGAGGTGGAAGACGATGTCCGGGAAAGAGAAA

(SEQ ID NO:21);

using the following amplification primer couples:

CD133:

Primer Forward: CTATGTGGTACAGCCGCGTG (SEQ ID NO:22)

Primer Reverse: TAATCAATTTTGGATTCATATGCCTTC (SEQ ID NO:23)

c-myc

primer Forward: ATGAGGAGACACCGCCAC (SEQ ID NO:24)

primer Reverse: AACATCGATTCTTCCTCATCTTCTT (SEQ ID NO:25)

Nanog:

primer Forward: GCAAATGTCTTCTGCTGAGATGC (SEQ ID NO:26)

primer Reverse: GCTGTCCTGAATAAGCAGATCCAT (SEQ ID NO:27)

Oct4:

primer Forward: ACTGCAGCAGATCAGCCACA (SEQ ID NO:28)

primer Reverse: TGGCGCCGGTTACAGAAC (SEQ ID NO:29)

TCFL1:

primer Forward: CCGCGGGACTATTTTCGC (SEQ ID NO:30)

primer Reverse: AAAGAACGCGCTGTCCTGAG (SEQ ID NO:31)

ZIC1:

primer Forward: CAGTTCGCTGCGCAAACA (SEQ ID NO:32)

primer Reverse: GAGCCCTGCGAGGAGGAT (SEQ ID NO:33)

KLF5:

primer Forward: GCATCCACTACTGCGATTACCC (SEQ ID NO:34)

primer Reverse: TGAGAAGACTTGGTATAAACTTTTGTGC (SEQ ID NO:35)

HMGA1:

primer Forward: AAAACAAGGGTGCTGCCAA (SEQ ID NO:36)

primer Reverse: CCTTCCTGGAGTTGTGGTGGT (SEQ ID NO:37)

HMGB3:

primer Forward: TTTTCCAAGAAGTGCTCTGAGAGG (SEQ ID NO:38)

primer Reverse: TTTCTCTTTCCCGGACATCG (SEQ ID NO:39)

and using the following primer couples for the normalization of the gene sequence expression:

primer forward: CGT GCT GCT GAC CGA GG (SEQ ID NO:79)

primer reverse: GAA GGT CTC AAA CAT GAT CTG GGT (SEQ ID NO:80)

16) Method according to claim 9, wherein said one or more genes are detected by means of real time TaqMan by amplification of at least one of the following sequences:

cd133

TCCACAGAAATTTACCTACATT

GGAAGAGTATGATTCATACTGGTGGCTGGGTGGCCTGGTCATCTGCTCTCTGCTG
ACCC (SEQ ID NO:40)

c myc

GCTGGATTTTTTTCGGGTAGTGGAACAGCAGCCT

CCCGCGACGATGCCCTCAACGTTAGCTTCACCAACAGGAACTA (SEQ ID NO:41)

nanog:

CCGAAGAATAGCAATGGTGTGACGCAG

AAGGCCTCAGCACCTACCTACCCCAGCCTTTACTCTTCCTACCACCAGGGATG

(SEQ ID NO:42)

oct 4:

AACCCGGAGGAGGTAGTCCTTTGTTACATGCATGAGTCAGTGAACAGGGAATGGG

TGAATGACATTTGTGGGTAGGTTATT (SEQ ID NO:43)

tcfl1:

CCAAGGAAGAGAACGTTGACATAGAAGGCTCTTTGTGTTTTTCCTTGTCTTTTGT

CCTCAGACTTGATCCTGCTCCCTCGG (SEQ ID NO:44)

zic 1:

CGCGCTCCGAGAATTTAAAGATCCACAAAAGGACGCACACAGGGAGAAGCCCTTC

AAGTGCGAGTTTGAGGGCTGTGACC (SEQ ID NO:45)

KLF5:

TTTAACCCACCTCCATCCTATGCTGCTACAATTGCTTCTAAACTGGCAATTCAC

AATCCAAATTTACCCACCACCCTGCC (SEQ ID NO:46)

HMGA1:

CCCCAGGCAGACCTTATATGAGACATGGGAGTCCCACCGTATTGTCCAGGCTGGT

CTCGAACTCCTGACCTCAAGCA (SEQ ID NO:47)

HMGB3:

CGCTATGATCGGGAAATGAAGGATTATGGACCAGCTAAGGGAGGCAAGAAGAAGA

AGGATCCTAATGCTCCCAAAGGCCA (SEQ ID NO:48);

using the following amplification primer and probes:

cd133

primer Forward: TCCACAGAAATTTACCTACATTGGAA (SEQ ID NO:49)

primer Reverse: GGGTCAGCAGAGAGCAGATGA (SEQ ID NO:50)

probe: AGTATGATTTCATACTGGTGGCTGGGTGGC (SEQ ID NO:51)

c myc:

primer forward :GCTGGATTTTTTTTCGGGTAGTG (SEQ ID NO:52)

primer reverse: TAGTTCCTGTTGGTGAAGCTAACG (SEQ ID NO:53)

probe CAGCAGCCTCCCGCGACG (SEQ ID NO:54)

nanog:

primer forward: CCGAAGAATAGCAATGGTGTGA (SEQ ID NO:55)

primer reverse: GCATCCCTGGTGGTAGGAAGA (SEQ ID NO:56)

probe: CAGCACCTACCTACCCCAGCCTTTA (SEQ ID NO:57)

oct 4:

primer forward: AACCCGGAGGAGGTAGTCCTT (SEQ ID NO:58)

primer reverse: AATAACCTACCCACAAATGTCATTCA (SEQ ID NO:59)

probe: CATGCATGAGTCAGTGAACAGGGAA (SEQ ID NO:60)

tcfl1:

primer forward: CCAAGGAAGAGAACGTTGACATAG (SEQ ID NO:61)

primer reverse: CCGAGGGAGCAGGATCAAG (SEQ ID NO:62)

probe: AGGCTCTTTGTGTTTTTCCTTGTCTTTTGTCC (SEQ ID NO:63)

zic 1:

primer forward: CGCGCTCCGAGAATTTAAAG (SEQ ID NO:64)

primer reverse: CGGTCACAGCCCTCAAACCTC (SEQ ID NO:65)

probe: TCCACAAAAGGACGCACACAGGG (SEQ ID NO:66)

KLF5:

Primer forward: TTTAACCCACCTCCATCCTATG (SEQ ID NO:67)

Primer reverse: GGCAGGGTGGTGGGTAAATT (SEQ ID NO:68)

Probe: TGCTTCTAAACTGGCAATTCACAATC (SEQ ID NO:69)

HMGA1:

Primer forward: CCCCAGGCAGACCTTATATGAG (SEQ ID NO:70)

Primer reverse: TGCTTGAGGTCAGGAGTTCGA (SEQ ID NO:71)

Probe: CATGGGAGTCCCACCGTATTGTCCA (SEQ ID NO:72)

HMGB3:

primer forward: CGCTATGATCGGGAAATGAAG (SEQ ID NO:73)

primer reverse: TGGCCTTTTGGGAGCATTAG (SEQ ID NO:74)

probe: ATTATGGACCAGCTAAGGGAGGCAAG (SEQ ID NO:75)

and using the following primers and probe for the normalization of gene sequence expression:

primer Forward: GCCAACCGCGAGAAGATG (SEQ ID NO:81)

primer Reverse: ACAGCCTGGATAGCAACGTACA (SEQ ID NO:82)

probe: CCCAATCATGTTTGAGACCTTCAAC (SEQ ID NO:83)

17) *In vitro* diagnostic kit for the evaluation of tumour histopathology phase and of the presence of metastasis by means of the detection of the expression of the sequence as defined in claim 1 in a biological sample by PCR Real-time comprising or consisting of the following amplification primers:

primer Forward: CGGGAATTCCCAGAGGACACCTCCAC (SEQ ID NO:3)

primer Reverse: CGGCTCGAGCCGAGGGTCTAACCCAG (SEQ ID NO:4)

and a control primer couple for the normalization of the expression value of the sequence of claim 1.

18) Kit according to claim 17 wherein the control primer for the normalization of the expression of the sequence of claim 1 are the following:

primer Forward: GAA AAG CCT TGT TTG TGC TTG C (SEQ ID NO: 5)

primer Reverse: GGG CCA TGC TAA TCT TCT CTG T (SEQ ID NO: 6)

19) *In vitro* diagnostic kit for the evaluation of the tumor histopathology phase and of the presence of metastasis by means of the detection of the expression of the sequence of claim 1 in a biological sample by taqman assay comprising or consisting of the following

primer and probe:

primer Forward: AGGACACCTCCACTCCGTCTAC (SEQ ID NO:7)

primer reverse: GCCTAACCAATGTGCAGACTACTG (SEQ ID NO:8)

probe: CAGTGTTTAGACTATCTGTTCAGGACTCCCAAATTG (SEQ ID NO:9)

20) *In vitro* diagnostic kit for the evaluation of the tumor histopathology phase and of the presence of metastasis by means of the detection of the expression of the sequence of claim 1 in a biological sample by TaqMan PCR real time comprising or consisting in the following primer and probe:

Primer Reverse CCCAGTGTTTAGACTATCTG (SEQ ID NO:10)

primer forward GAGACCCGCGGAAATC (SEQ ID NO:11)

probe GCTCCCGCACCGCGGGTCTCGA (SEQ ID NO:12)

21) Kit according to anyone of the claims form 17 to 20 that further comprises all the amplification primer couples for the detection of gene markers of tumours stem cells chosen among CD133, c-myc, Nanog, Oct4, TCFL1, ZIC1, KLF5, HMGA1, HMGB3 by PCR real Time, together with a primer couple for the normalization of gene sequence expression; said amplification primer couples being the following:

CD133:

Primer Forward: CTATGTGGTACAGCCGCGTG (SEQ ID NO:22)

Primer Reverse: TAATCAATTTTGGATTCATATGCCTTC (SEQ ID NO:23)

c-myc

primer Forward: ATGAGGAGACACCGCCAC (SEQ ID NO:24)

primer Reverse: AACATCGATTTCTTCCTCATCTTCTT (SEQ ID NO:25)

Nanog:

primer Forward: GCAAATGTCTTCTGCTGAGATGC (SEQ ID NO:26)

primer Reverse: GCTGTCCTGAATAAGCAGATCCAT (SEQ ID NO:27)

Oct4:

primer Forward: ACTGCAGCAGATCAGCCACA (SEQ ID NO:28)

primer Reverse: TGGCGCCGGTTACAGAAC (SEQ ID NO:29)

TCFL1:

primer Forward: CCGCGGGACTATTTTCGC (SEQ ID NO:30)

primer Reverse: AAAGAACGCGCTGTCCTGAG (SEQ ID NO:31)

ZIC1:

primer Forward: CAGTTCGCTGCGCAAACA (SEQ ID NO:32)

primer Reverse: GAGCCCTGCGAGGAGGAT (SEQ ID NO:33)

KLF5:

primer Forward: GCATCCACTACTGCGATTACCC (SEQ ID NO:34)

primer Reverse: TGAGAAGACTTGGTATAAACTTTTGTGC (SEQ ID NO:35)

HMGA1:

primer Forward: AAAAACAAGGGTGCTGCCAA (SEQ ID NO:36)

primer Reverse: CCTTCCTGGAGTTGTGGTGGT (SEQ ID NO:37)

HMGB3:

primer Forward: TTTTCCAAGAAGTGCTCTGAGAGG (SEQ ID NO:38)

primer Reverse: TTTCTCTTTCCCGGACATCG (SEQ ID NO:39)

said primer couple for the normalization of gene sequence expression being the following:

primer forward: CGT GCT GCT GAC CGA GG (SEQ ID NO:79)

primer reverse: GAA GGT CTC AAA CAT GAT CTG GGT (SEQ ID NO:80)

22) Kit according to anyone of the claims from 17 to 20 that further comprises one or more amplification primer couples and related probes for the detection of one or

more tumour stem cell genes chosen among CD133, c-myc, Nanog, Oct4, TCFL1, ZIC1, KLF5, HMGA1, HMGB3 by real Time TaqMan together with a primer couple and a probe for the normalization of gene sequence expression; said amplification primer couples and related probes being the following:

cd133

primer Forward: TCCACAGAAATTTACCTACATTGGAA (SEQ ID NO:49)

primer Reverse: GGGTCAGCAGAGAGCAGATGA (SEQ ID NO:50)

probe: AGTATGATTCATACTGGTGGCTGGGTGGC (SEQ ID NO:51)

c myc:

primer forward :GCTGGATTTTTTTTCGGGTAGTG (SEQ ID NO:52)

primer reverse: TAGTTCCTGTTGGTGAAGCTAACG (SEQ ID NO:53)

probe CAGCAGCCTCCCGCGACG (SEQ ID NO:54)

nanog:

primer forward: CCGAAGAATAGCAATGGTGTGA (SEQ ID NO:55)

primer reverse: GCATCCCTGGTGGTAGGAAGA (SEQ ID NO:56)

probe: CAGCACCTACCTACCCCAGCCTTTA (SEQ ID NO:57)

oct 4:

primer forward: AACCCGGAGGAGGTAGTCCTT (SEQ ID NO:58)

primer reverse: AATAACCTACCCACAAATGTCATTCA (SEQ ID NO:59)

probe: CATGCATGAGTCAGTGAACAGGGAA (SEQ ID NO:60)

tcfl1:

primer forward: CCAAGGAAGAGAACGTTGACATAG (SEQ ID NO:61)

primer reverse: CCGAGGGAGCAGGATCAAG (SEQ ID NO:62)

probe: AGGCTCTTTGTGTTTTTCCTTGTCTTTTGTCC (SEQ ID NO:63)

zic 1:

primer forward: CGCGCTCCGAGAATTTAAAG (SEQ ID NO:64)

primer reverse: CGGTCACAGCCCTCAAACCTC (SEQ ID NO:65)

probe: TCCACAAAAGGACGCACACAGGG (SEQ ID NO:66)

KLF5:

Primer forward: TTAAACCCACCTCCATCCTATG (SEQ ID NO:67)

Primer reverse: GGCAGGGTGGTGGGTAAATT (SEQ ID NO:68)

Probe: TGCTTCTAAACTGGCAATTCACAATC (SEQ ID NO:69)

HMGA1:

Primer forward: CCCCAGGCAGACCTTATATGAG (SEQ ID NO:70)

Primer reverse: TGCTTGAGGTCAGGAGTTCGA (SEQ ID NO:71)

Probe: CATGGGAGTCCCACCGTATTGTCCA (SEQ ID NO:72)

HMGB3:

primer forward: CGCTATGATCGGGAAATGAAG (SEQ ID NO:73)

primer reverse: TGGCCTTTTGGGAGCATTAG (SEQ ID NO:74)

probe: ATTATGGACCAGCTAAGGGAGGCAAG (SEQ ID NO:75)

said primer couple and probe for the normalization
of the gene sequence expression being the following:

primer Forward: GCCAACCGCGAGAAGATG (SEQ ID NO:81)

primer Reverse: ACAGCCTGGATAGCAACGTACA (SEQ ID NO:82)

probe: CCCAATCATGTTTGAGACCTTCAAC (SEQ ID NO:83)

Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

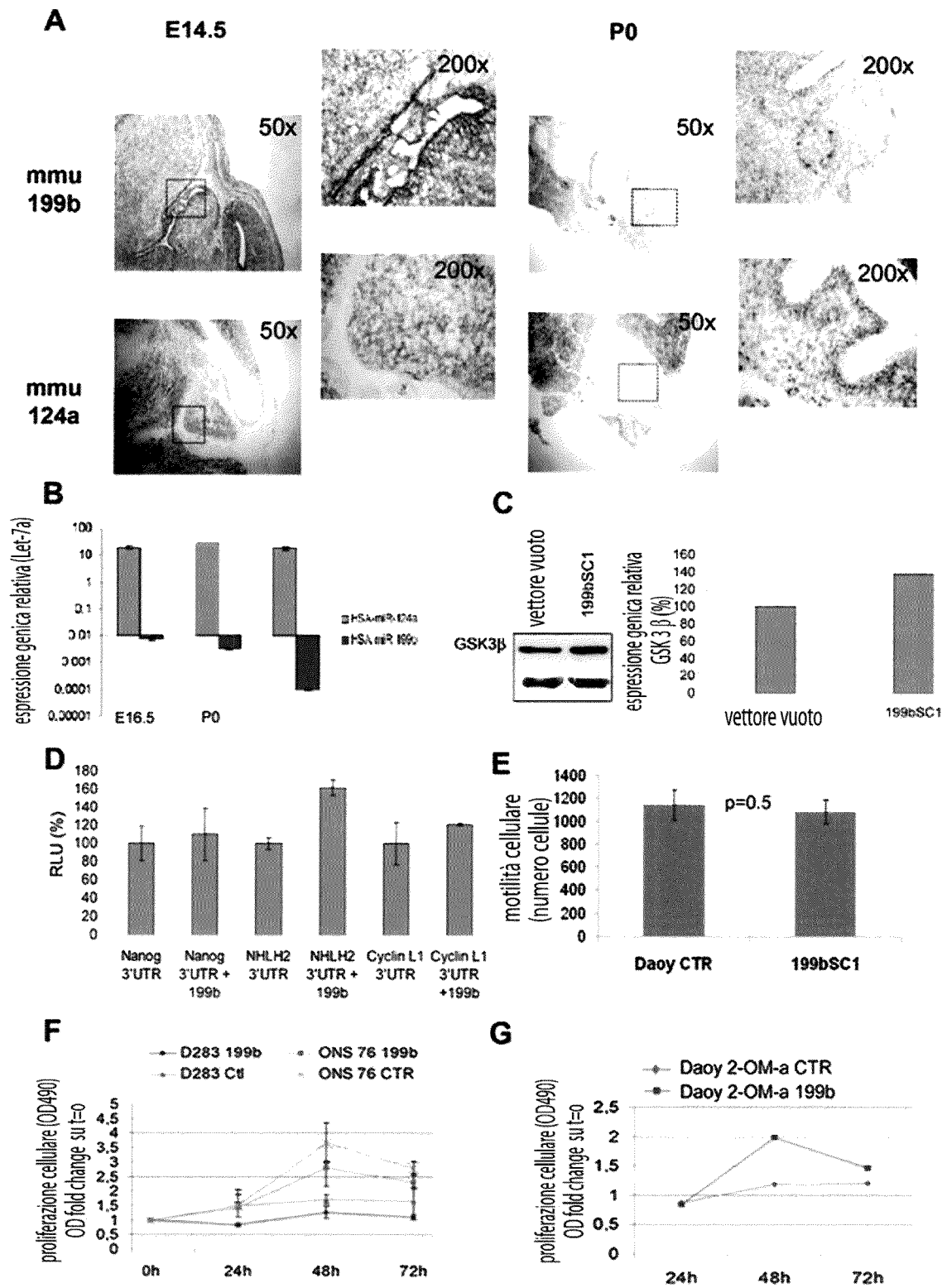


Fig. 10

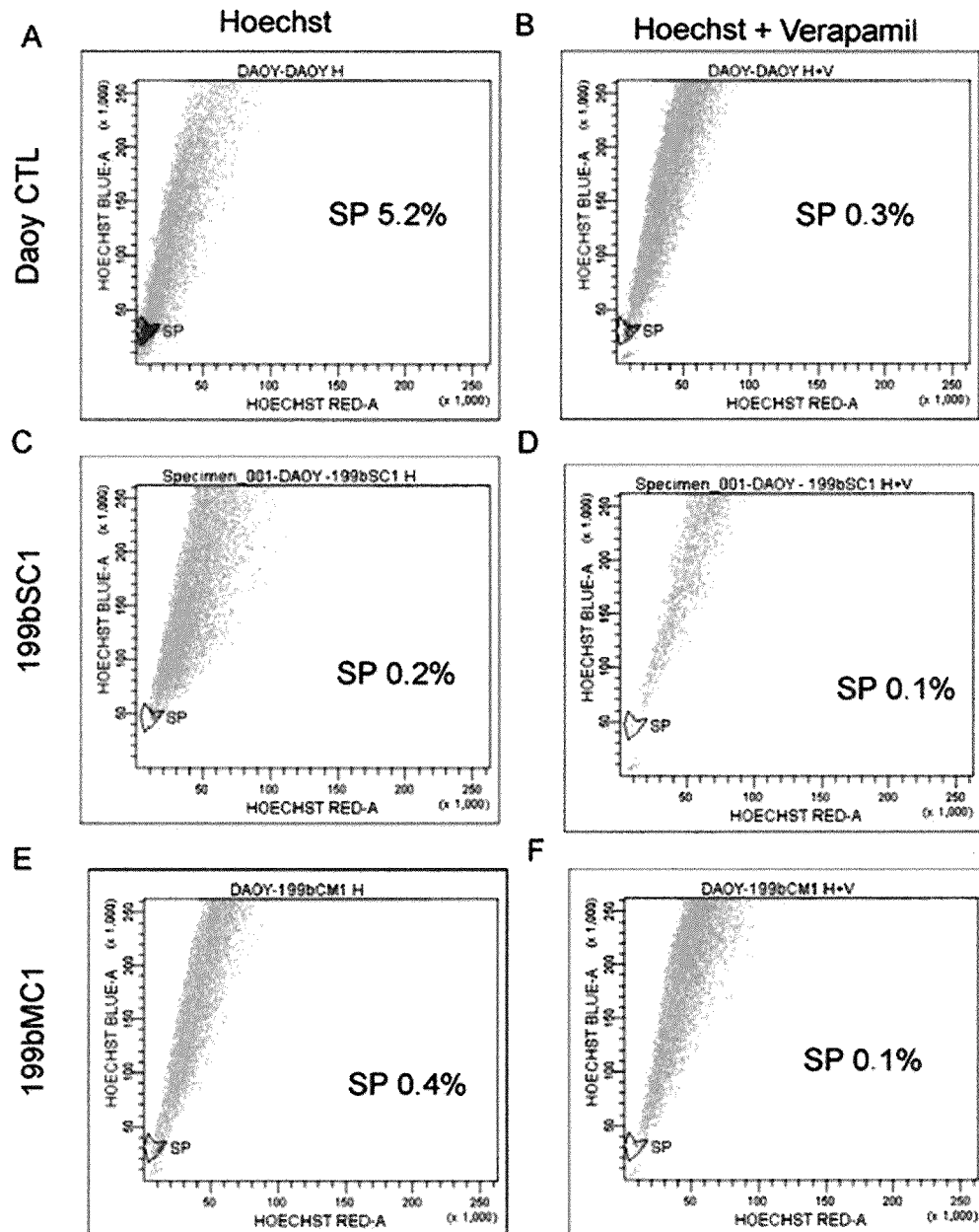


Fig. 11

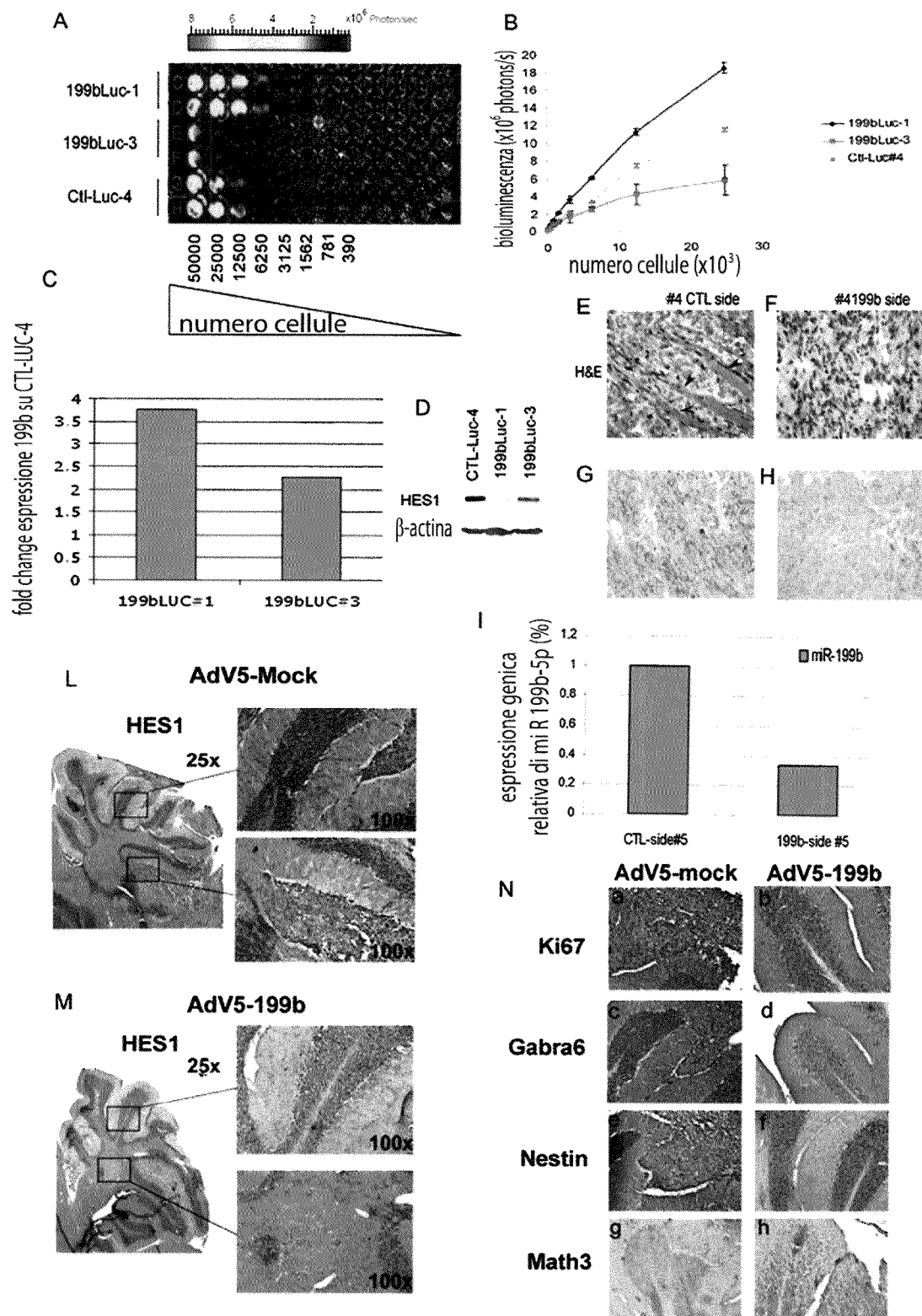


Fig. 12

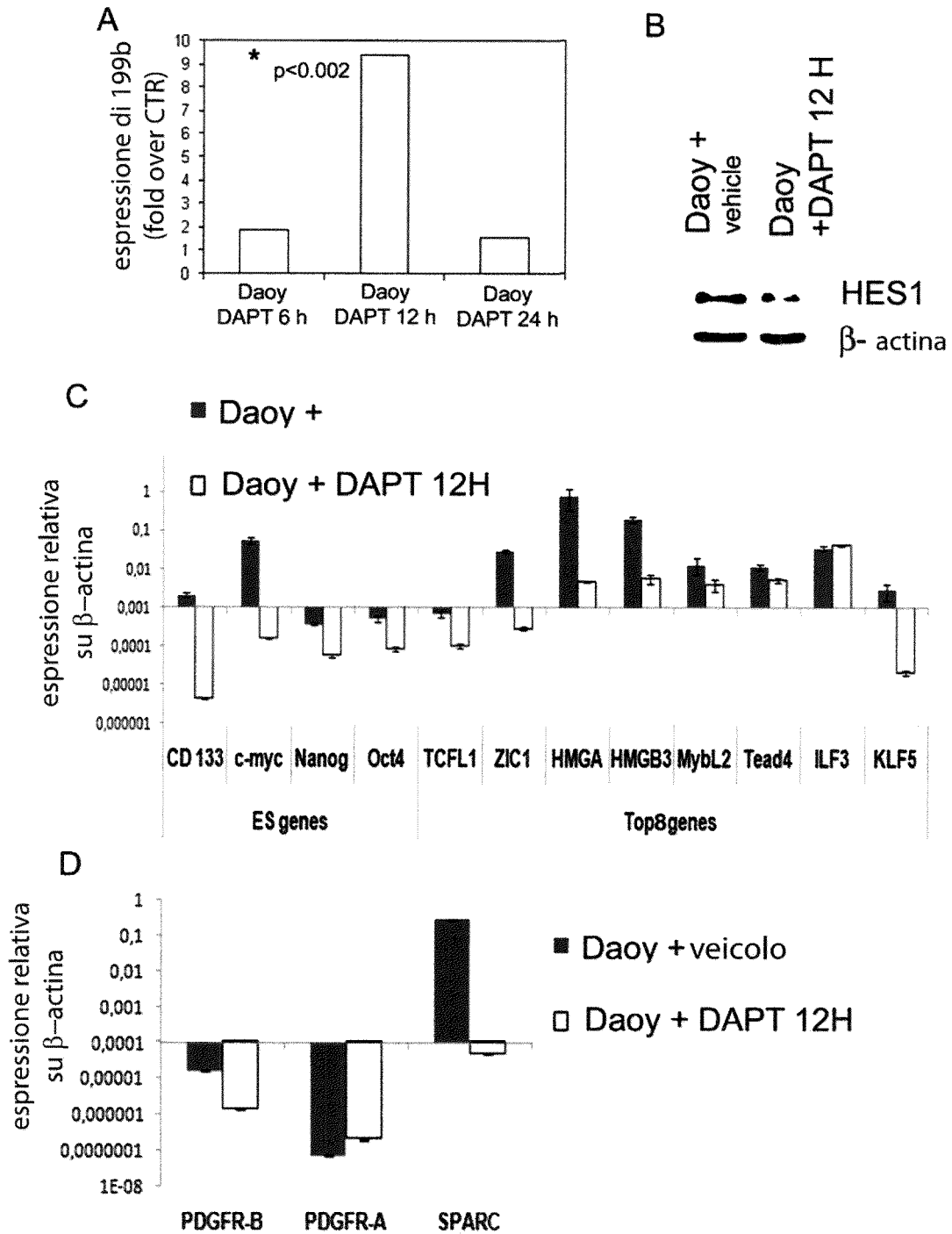
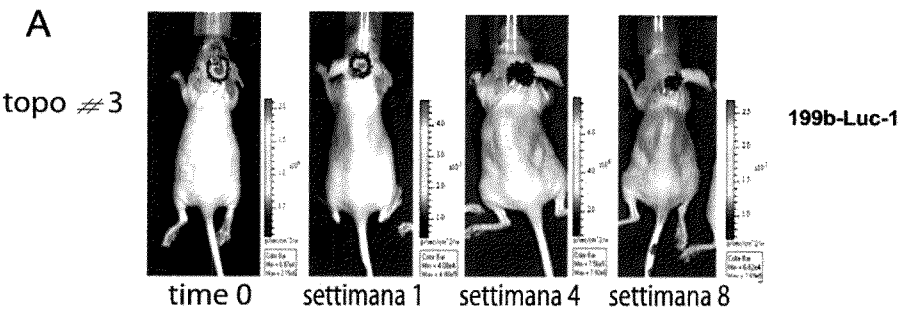


Fig. 13



B

misura BLI (p/sec/cm ² /sr)				
	time 0	settimana 1	settimana 4	settimana 8
Ctl-Luc-4 MOCK Adv5 mouse #7	4.67 × 10 ⁶	1.64 × 10 ⁶	1.06 × 10 ⁷	2.59 × 10 ⁵
Ctl-Luc-4 199b Adv5 mouse #3	3.13 × 10 ⁶	2 × 10 ⁵	3 × 10 ⁵	7 × 10 ⁴
199b Luc-1 mouse #3	3.42 × 10 ⁶	5.33 × 10 ⁴	1.87 × 10 ⁶	2.27 × 10 ⁵

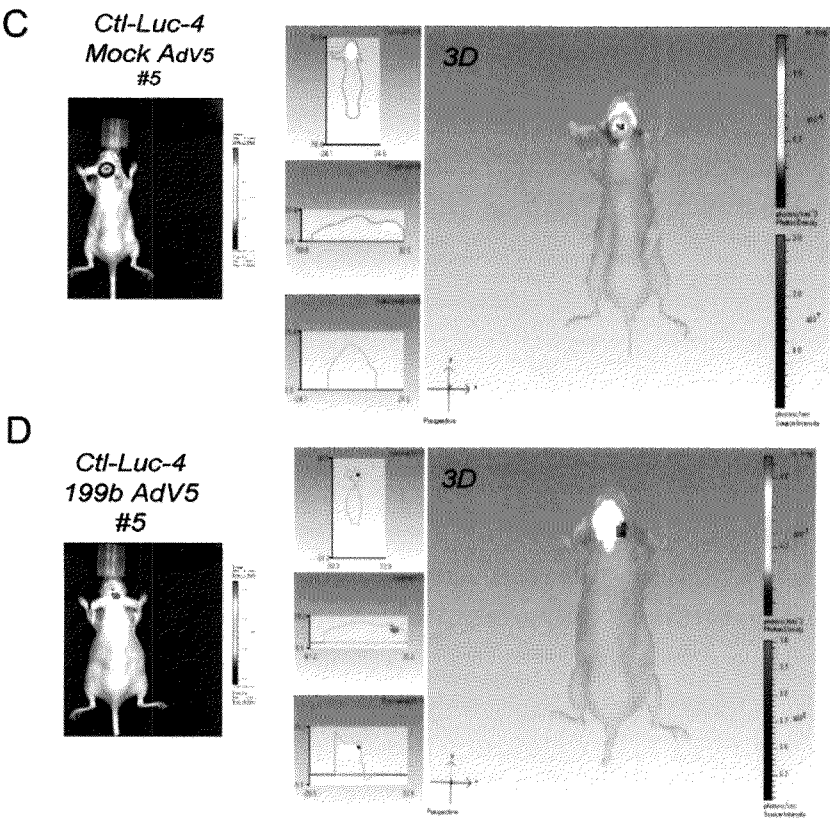


Fig. 14

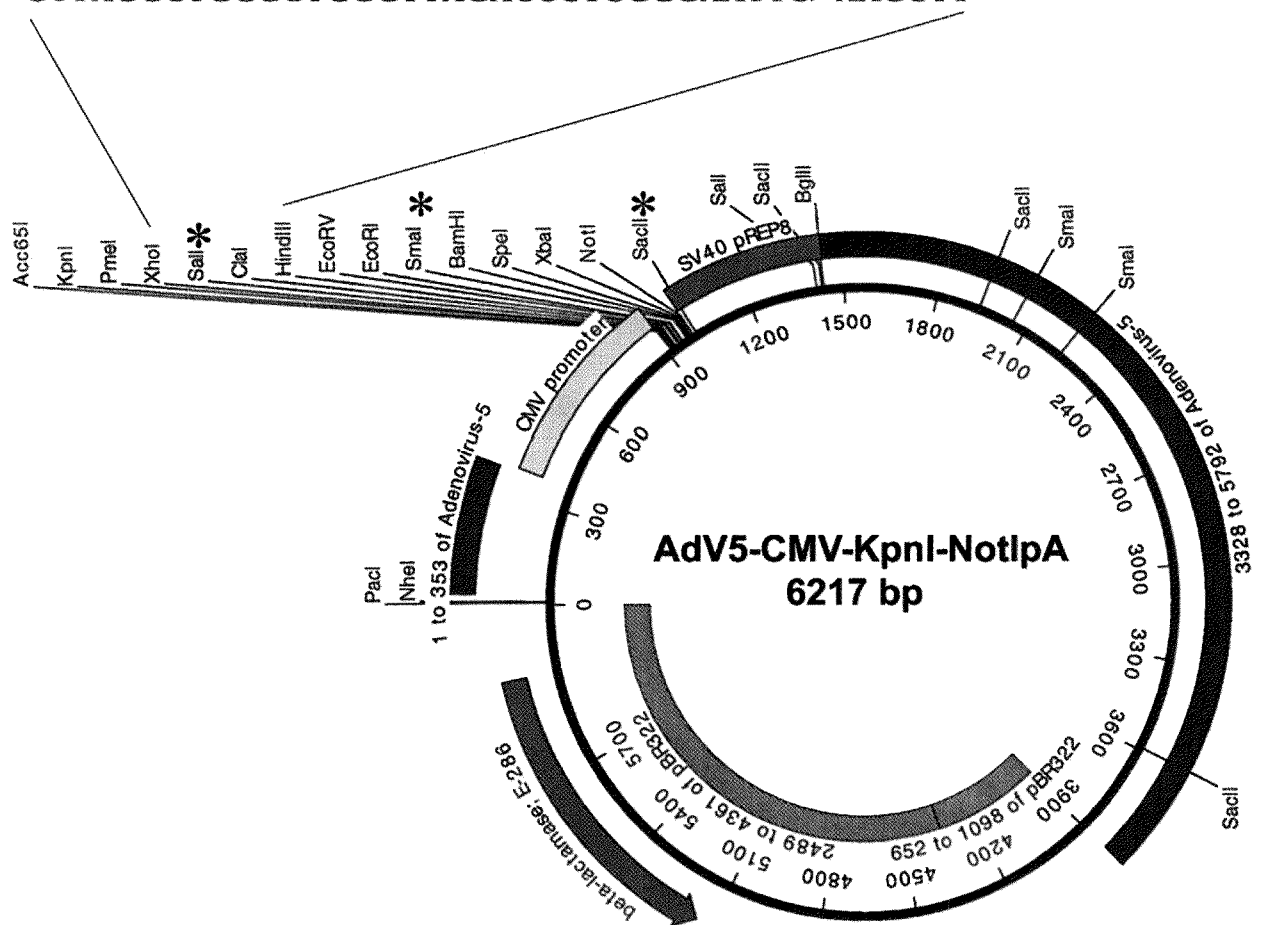


Fig.15

Ad5- CMV- KpnI - NotI pA 6217 BP

```

misc_feature 1..26
              /note="PacI restriction site TTAATTAA"
misc_feature 11..16
              /note="NheI site GCTAGC"
frag <27..>365
      /note="1 to 353 of Adenovirus-5"
misc_feature 913..1002
              /note="Multiple cloning site KpnI to NotI"
misc_feature 1437..1442
              /note="BglII restriction site AGATCT"
polyA_signal 995..1442
              /note="SV40 pREP8"
frag <1443..>3897
      /note="3328 to 5792 of Adenovirus-5"
frag 3898..4344
      /note="652 to 1098 of pBR322"
frag 4345..6217
      /note="2489 to 4361 of pBR322"
CDS complement(5149..6009)
      /note="beta-lactamase; E-286"
promoter 374..912
          /note="CMV promoter"

```

underlined polyA rev primer site

BASE COUNT 1391 A 1543 C 1732 G 1550 T 1 OTHER
ORIGIN

```

1  AATTAATTAA GCTAGCATCA TCAATAATAT ACCTTATTTT GGATTGAAGC CAATATGATA
61 ATGAGGGGGT GGAGTTTGTG ACGTGGCGCG GGGCGTGGGA ACGGGGCGGG TGACGTAGTA
121 GTGTGGCGGA AGTGTGATGT TGCAAGTGTG GCGGAACACA TGTAAAGCGAC GGATGTGGCA
181 AAAGTGACGT TTTTGGTGTG CGCCGGTGTG CACAGGAAGT GACAATTTTC GCGCGGTTTT
241 AGGCGGATGT TGTAGTAAAT TTGGGCGTAA CCGAGTAAGA TTTGGCCATT TCGCGGGGAA
301 AACTGAATAA GAGGAAGTGA AATCTGAATA ATTTTGTGTT ACTCATAGCG CGTAATATTT
361 GTCTAGGGAG ATCAGCCTGC AGGTCGTTAC ATAACTTACG GTAAATGGCC CGCCTGGCTG
421 ACCGCCCAAC GACCCCCGCC CATTGACGTC AATAATGACG TATGTTCCCA TAGTAACGCC
481 AATAGGGACT TTCCATTGAC GTCAATGGGT GGAGTATTTA CGGTAAACTG CCCACTTGGC
541 AGTACATCAA GTGTATCATA TGCCAAGTAC GCCCCCTATT GACGTCAATG ACGGTAATG
601 GCGCGCCTGG CATTATGCCC AGTACATGAC CTTATGGGAC TTTCTACTT GGCAGTACAT
661 CTACGTATTA GTCATCGCTA TTACCATGGT GATGCGGTTT TGGCAGTACA TCAATGGGCG
721 TGGATAGCGG TTTGACTCAC GGGGATTTC AAGTCTCCAC CCCATTGACG TCAATGGGAG
781 TTTGTTTTGG CACCAAAATC AACGGGACTT TCCAAAATGT CGTAACAAC CCGCCCCATT
841 GACGCAAATG GGCGGTAGGC GTGTACGGTG GGAGGTCTAT ATAAGCAGAG CTCGTTTAGT
901 GAACCGTCAG ATGGTACCGT TTAACCTCGA GGTGACGGT ATCGATAAGC TTGATATCGA
961 ATTCCTGCAG CCCGGGGGAT CCACTAGTTC TAGAGCGGCC GCCACGCGG GGAGATCCAG
1021 ACATGATAAG ATACATTGAT GAGTTTGGAC AAACCACAAC TAGAATGCAG TGAACAAAAT
1081 GCTTTATTTG TGAAATTTGT GATGCTATTG CTTTATTTGT AACCATTATA AGCTGCAATA
1141 AACAAGTTAA CAACAACAAT TGCATTCATT TTATGTTTCA GGTTCAGGGG GAGGTGTGGG
1201 AGGTTTTTTA AAGCAAGTAA AACCTCTACA AATGTGGTAT GGCTGATTAT GATCCCGGCT
1261 GCCTCGCGCG TTTGCGTGAT GACGGTGAAA ACCTCTTGAC ACATGCAGCT CCCGGAGACG
1321 GTCACAGCTT GTCTGTAAGC GGATGCCGGG AGCAGACAAG CCCGTAGGG CGCGTCAGCG

```

Fig. 16a

```

1381 GGT GTT GGC G GGT GT C G G G G C G C A G C C A T G A G G T C G A C T C T A G T C C C C G C G G T G G C A G A T
1441 C T G G A A G G T G C T G A G G T A C G A T G A G A C C C G C A C C A G G T G C A G A C C C T G C G A G T G T G G C G G
1501 T A A A C A T A T T A G G A A C C A G C C T G T G A T G C T G G A T G T G A C C G A G G A G C T G A G G C C G A T C A
1561 C T T G G T G C T G G C C T G C A C C C G C G C T G A G T T T G G C T C T A G C G A T G A A G A T A C A G A T T G A G G
1621 T A C T G A A A T G T G T G G G C G T G G C T T A A G G G T G G G A A A G A A T A T A T A A G G T G G G G T C T T A T
1681 G T A G T T T T G T A T C T G T T T T G C A G C A G C C G C C G C C C A T G A G C A C C A A C T C G T T T G A T G G
1741 A A G C A T T G T G A G C T C A T A T T T G A C A A C G C G C A T G C C C C C A T G G G C C G G G G T G C G T C A G A A
1801 T G T G A T G G G C T C C A G C A T T G A T G G T C G C C C C G T C C T G C C C G C A A A C T C T A C T A C C T T G A C
1861 C T A C G A G A C C G T G T C T G G A A C G C C G T T G G A G A C T G C A G C C T C C G C C C G C C T T C A G C C G C
1921 T G C A G C C A C C G C C C G C G G G A T T G T G A C T G A C T T T G C T T T C T G A G C C C G C T T G C A A G C A G
1981 T G C A G C T T C C G T T C A T C C G C C C G C A T G A C A A G T T G A C G G C T C T T T T G G C A C A A T T G G A
2041 T T C T T T G A C C C G G G A A C T T A A T G T C G T T T C T C A G C A G C T G T T G G A T C T G C G C C A G C A G G T
2101 T T C T G C C C T G A A G G C T T C C T C C C C A A T G C G G T T T A A A C A T A A A T A A A A A C C A G A
2161 C T C T G T T T G G A T T T G G A T C A A G C A A G T G T C T T G C T G T C T T A T T T T A G G G G T T T T G C G C G C
2221 G C G G T A G G C C C G G G A C C A G C G G T C T C G G T C G T G A G G G T C C T G T G T A T T T T T C C A G G A C
2281 G T G G T A A A G G T G A C T C T G G A T G T T C A G A T A C A T G G G C A T A A G C C C G T C T C T G G G G T G G A G
2341 G T A G C A C C A C T G C A G A G C T T C A T G C T G C G G G G T G G T G T G T G T A G A T G A T C C A G T C G T A G C A
2401 G G A G C G C T G G G C G T G G T G C C T A A A A A T G T C T T T C A G T A G C A A G C T G A T T G C C A G G G G C A G
2461 G C C C T T G G T G T A A G T G T T T A C A A A G C G G T T A A G C T G G G A T G G G T G C A T A C G T G G G G A T
2521 G A G A T G C A T C T T G A C T G T A T T T T A G G T T G G C T A T G T T C C A G C C A T A T C C G C C G G G
2581 A T T C A T G T T G T G C A G A A C C A C C A G C A C A G T G T A T C C G G T G C A C T T G G G A A A T T T G T C A T G
2641 T A G C T T A G A A G G A A T G C G T G G A A G A A C T T G G A G A C G C C C T T G T G A C C T C C A A G A T T T T C
2701 C A T G C A T T C G T C C A T A A T G A T G G C A A T G G G C C C A C G G G C G C G C G C C T G G G C G A A G A T A T T
2761 T C T G G G A T C A C T A A C G T C A T A G T T G T G T T C C A G G A T G A G A T C G T C A T A G G C C A T T T T T A C
2821 A A A G C G C G G G C G G A G G G T G C C A G A C T G C G G T A T A A T G G T T C C A T C C G G C C C A G G G G C G T A
2881 G T T A C C C T C A C A G A T T T G C A T T T C C C A C G C T T T G A G T T C A G A T G G G G G G A T C A T G T C T A C
2941 C T G C G G G G C G A T G A A G A A A A C G G T T T C C G G G T A G G G G A G A T C A G C T G G G A A G A A A G C A G
3001 G T T C C T G A G C A G C T G C G A C T A C C G C A G C C G G T G G G C C C G T A A A T C A C A C C T A T T A C C G G
3061 G T G C A A C T G G T A G T T A A G A G A G C T G C A G C T G C C G T C A T C C C T G A G C A G G G G G G C A C T T C
3121 G T T A A G C A T G T C C C T G A C T G C A T G T T T T C C C T G A C C A A A T C C G C C A G A A G G C G C T C G C C
3181 G C C C A G C G A T A G C A G T T C T T G A A G G A A G C A A A G T T T T T C A A C G G T T T G A A C C G T C C G C
3241 C G T A G G C A T G C T T T T G A G C G T T T G A C C A A G C A G T T C C A G G C G G T C C C A C A G C T C G G T C A C
3301 C T G C T C T A C G G C A T C T C G A T C C A G C A T A T C T C C T C G T T T C G C G G G T T G G G G C G G C T T T C G
3361 C T G T A C G G C A G T A G T C G G T G C T C G T C C A G A C G G G C C A G G G T C A T G T C T T T C C A C G G G C G C
3421 A G G G T C C T C G T C A G C G T A G T C T G G G T C A C G G T G A A G G G G T G C G C T C C G G G C T G C G C G C T G
3481 G C C A G G G T G C G C T T G A G G C T G G T C C T G C T G G T G C T G A A G C G C T G C C G G T C T T C G C C C T G C
3541 G C G T C G G C C A G G T A G C A T T T G A C C A T G G T G T C A T A G T C C A G C C C C T C C G C G G C G T G G C C C
3601 T T G G C G C G C A G C T T G C C C T T G G A G G A G G C G C C G C A C G A G G G C A G T G C A G A C T T T T G A G G
3661 G C G T A G A G C T T G G G C G C G A G A A A T A C C G A T T C C G G G G A G T A G G C A T C C G C G C C A G G C C
3721 C C G C A G A C G G T C T C G C A T T C C A C G A G C C A G G T G A G C T C T G G C C G T T C G G G G T C A A A A A C C
3781 A G G T T T C C C C C A T G C T T T T T G A T G C G T T T C T T A C C T C T G G T T T C A T G A G C C G G T G T C C A
3841 C G C T C G G T G A C G A A A A G G C T G T C C G T G T C C C C G T A T A C A G A C T T G A G A G G C C T G T C C T C G
3901 A C C G A T G C C C T T G A G A G C C T T C A A C C C A G T C A G C T C C T T C C G G T G G G C G C G G G C A T G A C
3961 T A T C G T C G C C G C A C T T A T G A C T G T C T T C T T A T C A T G C A A C T C G T A G G A C A G G T G C C G G C
4021 A G C G C T C T G G G T C A T T T T C G G C G A G A C C G C T T T C G C T G G A G C G C A C G A T G A T C G G C C T
4081 G T C G C T T G C G G A T T C G G A A T C T T G C A C G C C C T C G T C A A G C C T T C G T C A C T G T C C C G C
4141 C A C C A A A C G T T T C G G C G A G A A G C A G G C C A T T A T C G C C G G C A T G G C G G C C G A C G C G C T G G G
4201 C T A C G T C T T G C T G G C G T T C G C G A C G C G A G G C T G G A T G G C C T T C C C C A T T A T G A T T C T T C T
4261 C G C T T C C G G C G G C A T C G G G A T G C C C G C G T T G C A G G C C A T G C T G T C C A G G C A G G T A G A T G A
4321 C G A C C A T C A G G G A C A G C T T C A A G G C C A G C A A A G G C C A G G A A C C G T A A A A A G G C C G C G T T
4381 G C T G G C G T T T T C C A T A G G C T C C G C C C C C C T G A C G A G C A T C A C A A A A A T C G A C G C T C A A G
4441 T C A G A G G T G G C G A A A C C C G A C A G G A C T A T A A G A T A C C A G G C G T T C C C C C T G G A A G C T C
4501 C C C T G C G C G T C T C C T G T T C C G A C C T G C C G C T T A C C G G A T A C C T G T C C G C C T T T C T C C C
4561 T T C G G G A A G C G T G G C G C T T T C T C A T A G C T C A C G C T G T A G G T A T C T C A G T T C G G T G T A G G T
4621 C G T T C G C T C C A A G C T G G G C T G T G T G C A C G A A C C C C C C G T T C A G C C C G A C C G C T G C G C C T T
4681 A T C C G G T A A C T A T C G T C T T G A G T C C A A C C C G G T A A G A C A C G A C T T A T C G C C A C T G G C A G C
4741 A G C C A C T G G T A A C A G G A T T A G C A G A G C G A G G T A T G T A G G C G G T G C T A C A G A G T T C T T G A A

```

Fig. 16b

```

4801 GTGGTGGCCT AACTACGGCT AACTAGAAG GACAGTATTT GGTATCTGCG CTCTGCTGAA
4861 GCCAGTTACC TTCGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAAACAAA CCACCGCTGG
4921 TAGCGGTGGT TTTTTTGTTT GCAAGCAGCA GATTACGCGC AGAAAAAAG GATCTCAAGA
4981 AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG AACGAAAAC CACGTTAAGG
5041 GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT CTTACCTAG ATCCTTTTAA ATTAATAATG
5101 AAGTTTTAAA TCAATCTAAA GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT ACCAATGCTT
5161 AATCAGTGAG GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTCTG TCATCCATAG TTGCCTGACT
5221 CCCCCTCGTG TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCCA GTGCTGCAAT
5281 GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTTATCA GCAATAAACC AGCCAGCCGG
5341 AAGGGCCGAG CGCAGAAAGT GTCTTGCAAC TTTATCCGCC TCCATCCAGT CTATTAATTG
5401 TTGCCGGGAA GCTAGAGTAA GTAGTTCGCC AGTTAATAGT TTGCGCAACG TTGTTGCCAT
5461 TGCTGCAGGC ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTGGTATG GCTTCATTCA GCTCCGGTTC
5521 CCAACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC AAAAAAGCGG TTAGCTCCTT
5581 CGGTCCTCCG ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GGCCGCAGTG TTATCACTCA TGGTTATGGC
5641 AGCACTGCAT AATTCTCTTA CTGT CATGCC ATCCGTAAGA TGCTTTTCTG TGACTGGTGA
5701 GTACTCAACC AAGTCATTCT GAGAATAGTG TATGCGGCGA CCGAGTTGCT CTTGCCCCGC
5761 GTCAACACGG GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTCA TCATTGGAAG
5821 ACGTTCTTCG GGGCGAAAAA TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA GTTCGATGTA
5881 ACCCACTCGT GCACCCAACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT TTCACCAGCG TTTCTGGGTG
5941 AGCAAAAACA GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA AAAGGGAATA AGGGCGACAC GGAAATGTTG
6001 AATACTCATA CTCTTCCTTT TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT ATTGTCTCAT
6061 GAGCGGATAC ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA ATAGGGGTTT CGCGCACATT
6121 TCCCCGAAAA GTGCCACCTG ACGTCTAAGA AACCATTATT ATCATGACAT TAACCTATAA
6181 AAATAGGCGT ATCACGAGGC CCTTTCGTCT TCAAGAA

```

Fig. 16c