
**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA BIOMÉDICA**

**A REGULAÇÃO DO MIR-10B E DO MIR-603 PELAS PROTEÍNAS HMGA TEM
PAPEL CRÍTICO NA TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS DA TIREÓIDE**

PAULA MÜSSNICH DE FREITAS

Porto Alegre, 2012

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA BIOMÉDICA

PAULA MÜSSNICH DE FREITAS

A REGULAÇÃO DO MIR-10B E DO MIR-603 PELAS PROTEÍNAS HMGA TEM
PAPEL CRÍTICO NA TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS DA TIREÓIDE

Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado
Orientadora

Prof. Dr. Alfredo Fusco
Co-orientador

Porto Alegre
2012

PAULA MÜSSNICH DE FREITAS

**A REGULAÇÃO DO MIR-10B E DO MIR-603 PELAS PROTEÍNAS HMGA TEM
PAPEL CRÍTICO NA TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS DA TIREÓIDE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica do Instituto de Geriatria e Gerontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Gerontologia Biomédica.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado

Co-orientador: Dr. Alfredo Fusco

Porto Alegre

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

F866r Freitas, Paula Mussnich de
A regulação do MIR-10B e do MIR-603 pelas proteínas HMGA tem papel crítico na transformação de células da tireóide / Paula Mussnich de Freitas. – Porto Alegre: PUCRS, 2012.

084 f.: il. tab.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Denise Cantarelli Machado.
Co-orientador: Prof. Dr. Alfredo Fusco.

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Instituto de Geriatria e Gerontologia. Doutorado em Gerontologia Biomédica.

1. TRANSFORMAÇÃO CELULAR NEOPLÁSICA. 2. GLÂNDULA TIREÓIDE/citologia. 3. PROTEÍNAS HMGA. 4. REGULAÇÃO NEOPLÁSICA DA EXPRESSÃO GÊNICA. 5. MICRORNAS. 6. PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS. 7. MOVIMENTO CELULAR. 8. ENVELHECIMENTO. 9. GERIATRIA. 10. GERONTOLOGIA. 11. IN VITRO. I. Machado, Denise Cantarelli. 2. Fusco, Alfredo. III. Título.

C.D.D. 618.9764
C.D.U. 577.122:616.441(043.2)
N.L.M. QZ 202

Rosária Maria Lúcia Prena Geremia
Bibliotecária CRB 10/196

PAULA MÜSSNICH DE FREITAS

**A REGULAÇÃO DO MIR-10B E DO MIR-603 PELAS PROTEÍNAS HMGA TEM
PAPEL CRÍTICO NA TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS DA TIREÓIDE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como pré-requisito para obtenção do grau de doutor.

Aprovada em _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Victor Hugo Valiati, PhD

Prof. Dr. Angelo Bòs, PhD

Prof. Dra. Clarice Sampaio Alho

AGRADECIMENTOS

A minha família, por todo amor, apoio e incentivo, principalmente a minha mãe e a minha avó Norma por acreditarem no meu potencial e por me darem sempre força para continuar, principalmente quando nem eu mais acreditava.

Aos meus amigos, pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas. Com vocês as pausas entre um parágrafo e outro de produção melhora tudo que tenho produzido na vida.

A Dra. Denise Cantarelli Machado, minha orientadora, por seus ensinamentos, confiança e supervisão durante todos estes anos.

Ao Dr. Alfredo Fusco por ter aberto para mim as portas do seu laboratório e me acolhido no seu grupo de pesquisa, pnermitindo a realização deste trabalho.

A Daniela D'Angelo e Vincenza Leone, dois anjos na minha vida, por tudo me que ensinaram e por todo carinho a mim dedicados durante o período que passei em Nápoles.

A CAPES (bolsa de doutorado sanduiche) por apoiar a realização deste trabalho.

A todos aqueles que de alguma forma fizeram parte desta caminhada, fazendo-a valer cada vez mais a pena.

RESUMO

A super expressão das proteínas HMGA (*High Mobility Group A*) além de ser uma característica de neoplasias humanas malignas tem uma papel essencial na transformação celular. O objetivo deste trabalho foi identificar os miRNAs associados as proteínas HMGA no processo de transformação celular, analisando perfil de expressão de microRNAs (miRNAs) em células da tireóide transformadas com o oncogene *v-ras-ki*, expressando ou não as proteínas HMGA. Entre os miRNAs regulados pela transformação celular, observou-se que o miR-10b, miR-21, miR-125b, miR-221 e o miR-222 são positivamente e o miR-34a and miR-603 são negativamente regulados pela expressão das proteínas HMGA. Assim focamos nossa atencao no miR-10b e no miR-603 cuja expressão parece ser dependente da presença das proteínas HMGA também em outros sistemas celulares. Igualmente, foi demonstrado que *CCND1* e *CCND2* são alvos do miR-603, e *PTEN* alvo do miR-10b. Além disso, os estudos funcionais demonstraram que o miR-10b e o miR-603 são capazes de regular positiva e negativamente a proliferação celular e migração, sugerindo um papel da sua desregulação na transformação de células da tireóide.

Palavras-chave: HMGA, miRNA, células da tireóide

ABSTRACT

HMGA overexpression, other than to be a feature of human malignant neoplasias, has a causal role in cell transformation. Then, the aim of our study has been to investigate the miRNAs regulated by the HMGA proteins in the process of cell transformation analyzing the miRNA expression profile of *v-ras-ki* oncogene-transformed thyroid cells expressing or not HMGA proteins. We demonstrate that, among the miRNAs regulated by cell transformation, there are miR-10b, miR-21, miR-125b, miR-221 and miR-222 that are positively and miR-34a and miR-603 that are negatively regulated, by HMGA expression. Then, we focused our attention on the miR-10b and miR-603 whose expression appeared to be dependent on the presence of the HMGA proteins also in other cell systems. We found that miR-10b is able to target the *PTEN* gene, whereas miR-603 targets *CCND1* and *CCND2* genes. Moreover, functional studies showed that miR-10b and miR-603 were able to regulate positively and negatively, respectively, cell proliferation and migration suggesting a role of their deregulation in thyroid cell transformation.

Key words: HMGA, miRNA, Thyroid cells

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático dos processos envolvidos na carcinogênese.....	18
Figura 2. Distribuição dos tipos de câncer pelo índice de desenvolvimento humano.	23
Figura 3. Mecanismo de ação das proteínas HMGA	27
Figura 4. Validação do microarray por RT-PCR.	37
Figura 5. Expressão do miR-10b e miR-603 em células MCF-7 transfectadas com HMGA1 e MCF7 wild type e MEFs hmga1 ^{-/-} e <i>wild type</i>	38
Figura 6. HMGA1 e HMGA2 se ligam a região <i>upstream</i> do miR-10b e do miR-603.	39
Figura 7. CCND1 e da CCND2 são alvos do miR-603.	41
Figura 8. PTEN é alvo do miR-10b.....	43
Figura 9. Efeitos do miR-10b e miR-603 na proliferação celular..	45
Figura 10. Papel do miR-10b e do miR-603 na migração celular..	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alguns genes supressores de tumor em humanos	20
Tabela 2. Alguns oncogenes em tumores humanos	21
Tabela 3. miRNAs positivamente regulados nas células FRTL5-ki vs FRTL5.	35
Tabela 4. miRNAs negativamente regulados nas células FRTL5-ki vs FRTL5.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AT- <i>Hook</i>	ganchos-AT
CCND1	ciclina D1
CCND2	ciclina D2
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
ChIP	experimentos de imunoprecipitação da cromatina
FRO	linhagem humana de câncer da tireóide
<i>HMGs</i>	<i>High-Mobility-Group Proteins</i>
HMGA	<i>High Mobility Group A Proteins</i>
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
IDH	índice de desenvolvimento humano
IGG	Instituto de Geriatria e Gerontologia
MEFs	fibroblastos embrionários de camundongos
miRNAs	microRNAs
OMS	Organização Mundial da Saúde
pRL-CMV	plasmídeo <i>Renilla</i> luciferase reporter
PTC	carcinoma papilar da tireóide
PTEN	Fosfatase homóloga à tensina
shRNA	<i>Short hairpin</i> RNA

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 CÂNCER E ENVELHECIMENTO HUMANO	17
2.2 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER	22
2.3 CÂNCER DE TIREÓIDE	24
2.4 PROTEÍNAS HMGA E MIRNAS	25
3 OBJETIVOS	29
3.1 OBJETIVO GERAL	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4 METODOLOGIA.....	30
4.1 MIRNACHIP MICROARRAY.....	30
4.2 EXTRAÇÃO DE RNA E RT-PCR.....	30
4.3 LINHAGENS CELULARES E TRANSFEÇÕES	30
4.4 ENSAIO DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DA CROMATINA.....	31
4.5 PLASMÍDEOS E CONSTRUTOS	31
4.6 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS, WESTERN BLOTTING E ANTICORPOS.....	31
4.7 ENSAIO DE LUCIFERASE	32
4.8 CURVAS DE CRESCIMENTO.....	32
4.9 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS	32
4.10 CITOMETRIA DE FLUXO	33
4.11 ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS	33
4.12 ÉTICA	33
5 RESULTADOS	34

5.1 PERFIL DE EXPRESSÃO DOS MIRNAS DE CÉLULAS DE TIREÓIDE NORMAL E TRANSFORMADAS	34
5.2 AS PROTEÍNAS HMGA1 SE LIGAM À REGIÃO <i>UPSTREAM</i> DO MIR-10B E DO MIR-603.....	38
5.3 CCND1 E CCND2 SÃO ALVOS DO MIR-603	40
5.4 PTEN É ALVO DO MIR-10b.....	42
5.5 A EXPRESSÃO DO MIR-10B E DO MIR-603 AFETA A PROLIFERAÇÃO CELULAR DE MANEIRA ANTAGÔNICA.....	43
5.6 A EXPRESSÃO DO MIR-10B E DO MIR-603 AFETA A MIGRAÇÃO CELULAR	46
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÕES	49
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
9 REFERÊNCIAS.....	52
ANEXOS	60
ANEXO 1 - CARTA DE APROVAÇÃO DO CEP	61
ANEXO 2 - MATERIAL SUPLEMENTAR.....	62
ANEXO 3 - ARTIGOS PUBLICADOS	63

1 INTRODUÇÃO

O câncer não é uma doença única, mas um grupo heterogêneo de doenças que tem na sua origem o mesmo processo desordenado de divisão celular. Os avanços na pesquisa do câncer durante os últimos anos demonstraram que todos os tumores têm em sua origem alterações no DNA. O DNA e o RNA são moléculas de grande importância por constituírem o material genético das células. Os genes, responsáveis pela transmissão das informações hereditárias, são segmentos das moléculas de DNA, responsáveis pela síntese de todas as proteínas celulares e, nesse processo de fabricação, o RNA também participa. Assim, DNA e RNA controlam a fabricação de todas as proteínas (estruturais e enzimáticas) das células.¹

Muitos estudos demonstram que durante o processo do envelhecimento ocorrem danos a moléculas essenciais como o DNA e as proteínas, os quais aumentam com a idade, indicando que a capacidade de reparo do DNA é um importante determinante na taxa de envelhecimento celular e molecular.^{2,3}

O dano ao DNA e as proteínas pode ser considerado uma das principais causas do envelhecimento como demonstram algumas das diferentes teorias do envelhecimento. Entre elas podemos citar: Teoria das proteínas alteradas, teoria do dano e reparo do DNA, da teoria do erro catastrófico, teoria da desdiferenciação e a teoria dos radicais livres.

Os sistemas de reparo do DNA são uma das melhores defesas que a célula possui para neutralizar a carcinogênese. De fato, é amplamente aceito que uma das etapas cruciais na carcinogênese é o comprometimento de um ou mais sistemas de reparo do DNA. Vários estudos propõem que as proteínas HMGA têm um importante papel no reparo do DNA. A HMGA1 pode competir com a p53 e com as proteínas homologas MutS humanas (MSH2-MSH6) pela ligação com a junção Holliday (uma junção móvel entre quatro fitas de DNA que ocorrem durante o processo de

recombinação homóloga e importante na manutenção da integridade do genoma) exercendo uma influência negativa sobre a resposta de reparo as mutações de sentido trocado no DNA.⁴

Uma série de genes envolvidos no reparo do DNA são negativamente regulados pelas células humanas de câncer de mama MCF7, devido a super expressão da HMGA1, sugerindo que essas possam influenciar o reparo do DNA regulando negativamente a atividade transcricional dos genes envolvidos em vários aspectos do reconhecimento e remoção de danos ao DNA.⁵

A super expressão das proteínas HMGA é uma característica de tumores malignos. Ambos os genes HMGA1 e HMGA2 são amplamente expressos durante a embriogênese e em tecidos neoplásicos (incluindo pâncreas, da tireóide, mama, cólon, pulmão, ovário, do útero, próstata, carcinomas gástricos, carcinomas de células escamosas dos tumores orais cabeça cavidade, e pescoço), enquanto a sua expressão está ausente ou muito baixa em tecidos adultos.⁶⁻¹¹

A expressão da proteína HMGA está associada com um fenótipo altamente maligno. De fato, uma correlação significativa foi detectada entre os níveis elevados de expressão da proteína HMGA1 e a presença de metástase linfonodal e estadiamento clínico avançado em carcinomas de cólon.¹²

A correlação entre os níveis das proteínas HMGA e o fenótipo maligno se tornou importante para determinar o seu papel no processo de transformação celular e, em particular, para investigar se o seu aumento é um fenômeno periféricamente associado com a transformação celular ou se tem uma relação causal com o fenótipo maligno. Vários estudos indicam que as proteínas HMGA têm atividades oncogênicas, sendo causalmente envolvidas na transformação neoplásica. Além disso, o bloqueio da síntese das proteínas HMGA1 por metodologias antisense ou por shRNA reduz a proliferação independente de ancoragem em soft agar e aumenta a susceptibilidade à *anoikis* nas células de carcinoma pancreático e de pulmão.¹³

O aumento da expressão de ambas as proteínas HMGA1 e HMGA2 levam à transformação neoplásica de vários tipos de células, crescimento celular independente de ancoragem e a capacidade de formar tumores primários e metastáticos em ratos atímicos.¹⁴ Finalmente, a super expressão destas proteínas

em ratos transgênicos conduz a uma elevada incidência de lipomas e linfomas de células NK-T/NK.^{15,16}

Recentemente, os microRNAs (miRNAs ou Mirs) surgiram como uma importante classe de pequenos RNAs endógenos que atuam como reguladores pós-transcricionais da expressão gênica. Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA com 19-22 nucleotídeos, que derivam de RNAs de fita dupla (dsRNAs). Atualmente, os miRNAs são uma das moléculas reguladoras mais importantes que modulam a expressão gênica a nível pós-transcricional, tendo como alvo mRNAs para clivagem direta ou pela repressão da tradução.¹⁷

Estima-se que o genoma humano contém aproximadamente 1.000 miRNAs e que eles podem regular perto de 30% dos genes humanos, demonstrando assim o grande potencial regulatório proporcionado pelos miRNAs¹⁸⁻²⁰. Um grande corpo de evidências sugere que os miRNAs, tendo como alvo oncogenes ou genes supressores de tumor, desempenham um papel importante na etiologia e patogênese do câncer.²¹ Portanto, é razoável sugerir que as proteínas HMGA1 possam afetar a patogênese do câncer também regulando o padrão de expressão dos miRNAs promovendo a transformação celular. Sendo assim, analisamos o perfil de expressão dos miRNAs de células da tireóide normal de ratos, FRTL5, que não expressam as proteínas HMGA, de células FRTL5 transformadas pelo vírus do sarcoma murino de Kirsten (FRTL5-KiMSV) que expressam as proteínas HMGA1 e possuem um fenótipo altamente maligno, e de células FRTL5 transfectadas com um vetor que transporta o gene HMGA1 em uma orientação anti-senso, antes de serem infectadas com o vírus do sarcoma murino de Kirsten (FRTL5-KiMSV-HMGA1as). Estas células não expressam as proteínas HMGA1, mas expressam níveis significativos do oncogene retroviral transformado *v-ras-Ki* e não possuem a dependência de hormônios estimulantes da tireóide, mas, em contraste com as células não transfectadas, eles não crescem em soft agar ou formam tumores em ratos atímicos.¹⁴

Esta análise mostrou que trinta miRNAs são positivamente regulados enquanto 11 miRNAs são negativamente regulados, na linhagem de células FRTL5-KiMSV em relação às células normais da tireóide. Entre esses miRNAs regulados pela transformação celular, existem o miR-10b, miR-21, miR-125b, miR-221 e miR-

222 que são positivamente e miR-34a e miR-603 que são negativamente regulados, pela expressão da HMGA. Em seguida, concentramos nossa atenção no miR-10b e no miR-603, cuja expressão demonstrou-se dependente da presença das proteínas HMGA também em outros sistemas celulares. Relatamos que miR-10b e miR-603 são alvos dos genes *PTEN* e *CCND1-D2* (que codificam as proteínas cíclica D1 e cíclica D2), respectivamente, e são capazes de regular positiva e negativamente, a proliferação e a migração celular.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER E ENVELHECIMENTO HUMANO

Estudos epidemiológicos demonstram que o envelhecimento é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer. Além disso, no Brasil, com o aumento da expectativa de vida que alcançou 73,5 anos e o aumento da população com 65 anos ou mais, que era de 4,8% em 1991, passando a 5,9% em 2000 e chegando a 7,4% em 2010 a incidência do câncer tende a aumentar e a exposição aos diferentes fatores de risco para câncer por um longo período, pode ser uma explicação de porque o câncer é mais frequente em indivíduos idosos.²²

O câncer é um processo multifatorial e envolve interações entre mecanismos moleculares, celulares e sistêmicos, sendo caracterizado por uma proliferação anormal de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do organismo formando as metástases. Pode ser causado por fatores ambientais (tabagismo, radiação, agentes químicos e infecções do organismo) ou por fatores internos (mutações herdadas, condições imunes e mutações decorrentes do metabolismo) que são na maioria das vezes pré-determinados geneticamente. Tais fatores podem agir simultânea ou isoladamente promovendo o início da carcinogênese.²³

A nível celular, a carcinogênese pode ser vista como um processo múltiplo envolvendo seleção de células e mutações que geram um aumento na capacidade de proliferação, sobrevivência, invasão e metástase. É definido de forma conceitual, como sendo um processo através do qual as células normais transformam-se em células tumorais. As células cancerosas fogem dos controles proliferativos e criam seus próprios controles. Todo esse mecanismo complexo é coordenado por genes. Portanto o mecanismo da tumorigênese é resultado de uma série de alterações dos genes que atuam direta ou indiretamente no controle do ciclo celular.^{24,25}

O processo de carcinogênese divide-se basicamente em 3 etapas, iniciação, promoção e progressão, como pode ser observado a seguir na figura 1.



Fonte: INCA (2002, p. 58)

Figura 1. Diagrama esquemático dos processos envolvidos na carcinogênese.

As alterações genéticas que promovem o desenvolvimento de câncer ocorrem em duas classes de genes reguladores do crescimento, que estão presentes em células normais: os proto-oncogenes são parte normal e essencial do nosso material genético que pertencem a um grupo de genes relacionados ao crescimento e divisão celular. Na verdade são mudanças nestes genes que podem levar ao desenvolvimento do câncer, eles podem se tornar oncogenes, isto é desencadear a formação de tumores resultado de mutações, deleções, inserções ou super expressão. E os genes supressores de tumor, são inibidores de processos que levam à divisão celular, à proliferação que de alguma forma, regulam a diferenciação celular e induzem a morte celular programada quando há erros mutacionais. Alterações nestes genes podem provocar desenvolvimento de células com crescimento descontrolado.

Os genes supressores de tumor codificam proteínas que inibem a divisão celular. O primeiro gene supressor de tumor descrito foi o Rb o qual está localizado

no locus 13q14 e está associado ao desenvolvimento do retinoblastoma, que afeta aproximadamente 1 em 20.000 crianças em todo mundo.

O *p53* é o gene supressor de tumor mais frequentemente alterado em cânceres humanos. Alterações nestes genes são encontradas em aproximadamente 70% dos cânceres de cólon, em 30 a 50% dos cânceres de mama e em 50% dos cânceres de pulmão. Atualmente este gene é reconhecido como o gene que regula a transição da fase G1 para S do ciclo celular. Sempre que forem detectados danos ao DNA o gene *p53* tem o papel de suprimir a progressão do ciclo celular e a replicação do DNA. Assim, é capaz de monitorar o acúmulo de danos ao DNA, estendendo o período de transição para permitir que o dano seja reparado antes da sua fixação no genoma durante a replicação ou conduzindo as células a apoptose se o dano for irreparável. Assim, este gene não previne a ocorrência de um tipo de tumor em particular, como no caso de outros genes supressores de tumor, mas sim atua como supressor da tumorigênese.²⁶

Além dos tumores epiteliais, mutações no *p53* têm sido encontradas em leucemias, linfomas, sarcomas e tumores neurogênicos. Alguns dos genes supressores de tumor envolvidos no desenvolvimento de cânceres humanos estão listados na tabela a seguir.

Tabela 1. Alguns genes supressores de tumor em humanos

Gene	Tumor	Produto do Gene
Rb-1	Retinoblastoma; osteosarcoma; carcinoma de duto de mama; carcinoma de pulmão	Proteína que liga DNA, possível regulador de transcrição
p53	Astrocitoma; carcinoma de mama, cólon, pulmão e tireóide; osteossarcoma; e outros	Fator de transcrição (proteína que se liga a uma região específica do DNA)
WT-1	Tumor de Wilms, rabdomiossarcoma, carcinoma mamário e de pulmão; hepatoblastoma	Proteína que liga DNA, possível regulador de transcrição
DCC	Carcinoma de cólon	Receptor de superfície celular
NF1	Neurofibroma tipo 1	Interage com a proteína ras, induz hidrólise do GTP
APC	Carcinoma colorretal; polipose adenomatosa familiar	Proteína citoplasmática
FAP	Carcinoma de cólon	
MEN-1	Tumores de paratireóide, pâncreas, hipófise e córtex adrenal	
MLM	Melanoma familiar	

Fonte: Bases moleculares da biologia, da genética e da farmacologia, 2008.

A identificação dos produtos de proto-oncogenes e de genes supressores de tumor envolvidos no controle do ciclo celular possibilitou novos entendimentos de como a ativação de oncogenes ou a perda de genes supressores de tumor podem levar ao crescimento desordenado e constituição genética anormal das células ²⁷. Alguns dos principais oncogenes e seus produtos estão representados na tabela a seguir:

Tabela 2. Alguns oncogenes em tumores humanos

Gene	Tumor	Produto de Gene
<i>Abl</i>	Leucemia mielóide crônica e linfocítica aguda	Tirosina quinase
<i>bcl-1</i>	Linfomas de células B e mielomas múltiplos	Ciclina D1
<i>bcl-2</i>	Linfomas indiferenciados e foliculares	Proteína de membrana citoplasmática
<i>bcl-3</i>	Leucemias linfocíticas crônicas de células B	Fator de transcrição
<i>erb-B1</i>	Carcinoma de células escamosas; astrocitoma	Receptor de fator de crescimento
<i>neu/erb-B2</i>	Carcinoma de mama, ovário e estômago	Receptor de superfície para fator de crescimento
<i>Gip</i>	Carcinoma de ovário e glândula adrenal	
<i>Gli</i>	Glioblastoma	
<i>Gsp</i>	Adenoma de hipófise; carcinoma de tireóide	GDP/GTP transdutor de sinal citoplasmático
<i>Hst</i>	Carcinoma de estômago	Fator de crescimento
<i>Myc</i>	Linfoma de Burkitt; carcinoma de pulmão, mama e colo uterino	Fator de transcrição celular
<i>L-myc</i>	Carcinoma de células pequenas de pulmão	Fator de transcrição celular
<i>N-myc</i>	Neuroblastoma; carcinoma de pulmão	Fator de transcrição celular
<i>Raf</i>	Carcinoma de estômago	Serina/treonina quinase citoplasmática
<i>Ha-ras</i>	Carcinoma de bexiga, cólon, pulmão e pâncreas; melanoma	Proteína ligante de GDP/GTP
<i>Ki-ras</i>	Leucemia mielóide aguda e linfoblástica; carcinoma de tireóide; melanoma	Transdutor de sinal
<i>N-ras</i>	Carcinoma de trato geniturinário e tireóide; melanoma	Transdutor de sinal
<i>Ret</i>	Carcinoma de tireóide	Receptor de superfície celular
<i>K-sam</i>	Carcinoma de estômago	
<i>Sis</i>	Astrocitoma	
<i>Src</i>	Carcinoma de cólon	
<i>Trk</i>	Carcinoma de tireóide	Receptor de fator de crescimento
<i>jun, fos</i>	Vários tipos de tumores	Fator de transcrição

Fonte: Bases moleculares da biologia, da genética e da farmacologia, 2008.

Ainda que todos os tipos de câncer sejam causados por alterações nos genes responsáveis pelo controle do crescimento e divisão celular, isto não significa que seja hereditário, estima-se que apenas entre 5 e 10% de todos os casos de câncer são consequência de alterações genéticas hereditárias, ou seja, transmissível de pais para filhos, sendo o restante causado principalmente por dano (mutações) aos genes que são adquiridos durante a vida.²³

2.2 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER

O câncer vem se mantendo como uma das principais causas de morte no mundo, e se tornou um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial. É responsável por mais de seis milhões de óbitos a cada ano, representando cerca de 12% de todas as causas de morte no mundo.²⁹

O número de casos de câncer no mundo deverá aumentar em 75% até 2030, segundo um estudo realizado Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, na sigla em inglês), órgão ligado à Organização Mundial da Saúde (OMS)^{30,31}. Segundo a pesquisa, essa taxa pode ser ainda mais alta e chegar a 90% em países mais pobres. Este estudo foi baseado no registro de novos casos de câncer em 184 países no ano de 2008 e fizeram uma projeção da doença para 2030, quando a população mundial deverá estar mais numerosa e com um maior número de idosos. De acordo com o artigo, enquanto 12,7 milhões de pessoas tiveram câncer em 2008, 22,2 milhões de indivíduos em todo o mundo deverão receber o diagnóstico da doença em 2030. Segundo os autores, os tipos de câncer que serão mais prevalentes nos próximos anos vão variar de acordo com cada país. Em nações em desenvolvimento ou desenvolvidas como Estados Unidos, Brasil, Rússia e Reino Unido, por exemplo, o número de cânceres relacionados à obesidade, como o de mama e o colorretal, e ao tabagismo, especialmente o de pulmão, deverá crescer.^{30,31}

Outro estudo realizado recentemente utilizou o índice de desenvolvimento humano (IDH), (um índice composto de expectativa de vida, educação e produto interno bruto per capita) para caracterizar aspectos da incidência do câncer de

acordo com o nível de recurso e grau de desenvolvimento social, bem como as tendências para um cenário futuro. Na figura 2 pode-se observar a relação entre os diferentes tipos de câncer e o nível do IDH. Esses dados refletem no impacto que o câncer tem causado na população mundial e alertam para a tendência do aumento do número de casos em todo o mundo.³¹ Sendo assim, o desenvolvimento de medidas de diagnóstico precoce é de extrema importância para reverter este panorama.

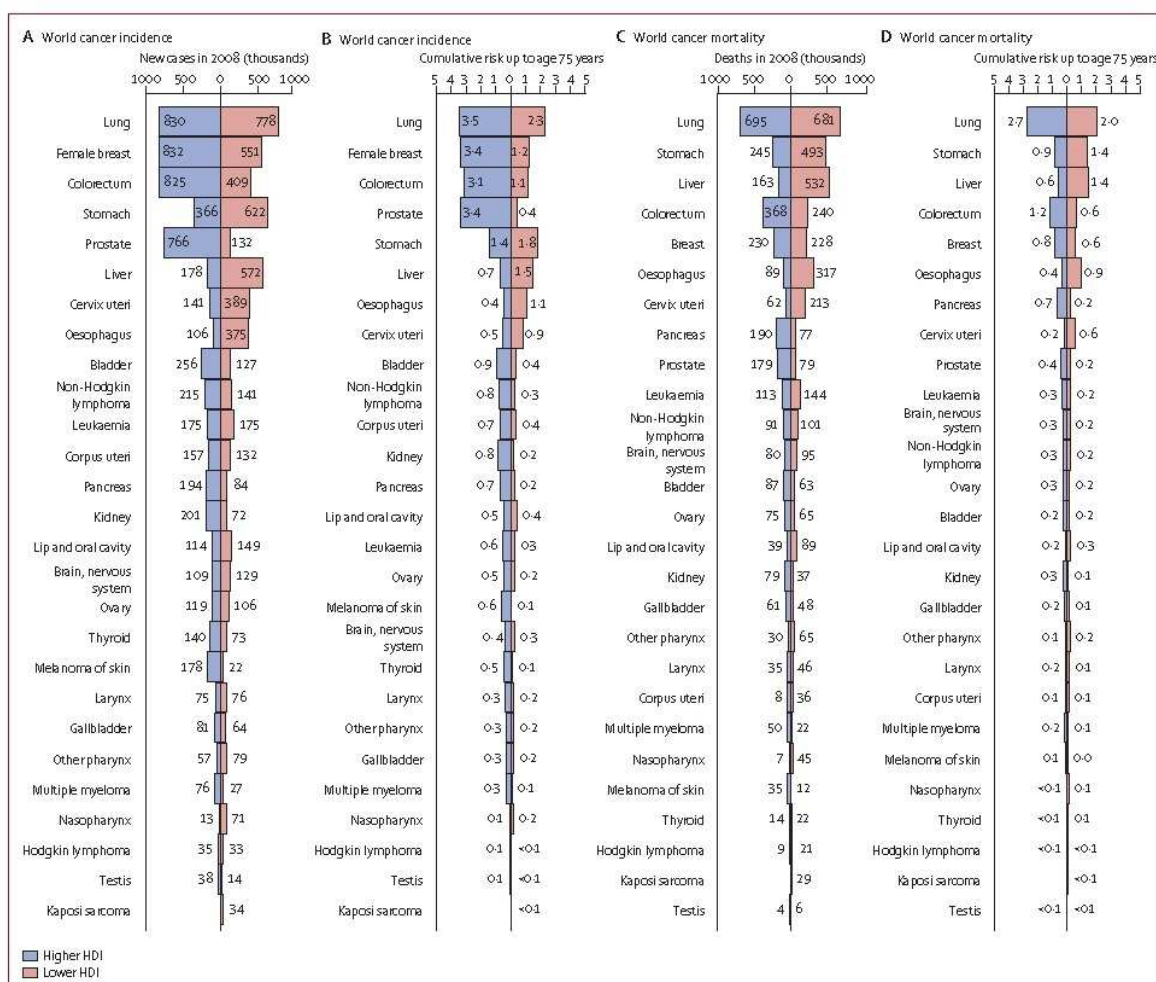


Figura 2. Distribuição dos tipos de câncer pelo índice de desenvolvimento humano. (A) Número de novos casos. (B) Risco cumulativo de incidência. (C) Número de mortes. (D) Risco cumulativo de morte. Fonte: Bray et al, 2012.

2.3 CÂNCER DE TIREÓIDE

Os tumores da tireóide são a malignidade mais comum no sistema endócrino e as taxas de incidência têm aumentado nas últimas décadas. Em 2008, aproximadamente 37.000 novos casos foram diagnosticados nos Estados Unidos.³¹⁻³³

O carcinoma indiferenciado de tireóide incide entre 10 a 15% das neoplasias tireoidianas malignas. Na maioria dos países, as taxas de incidência vêm mostrando um padrão de crescimento lento, porém contínuo (cerca de 1% ao ano) durante as últimas décadas. Para o Brasil, segundo as estimativas do INCA sobre incidência de câncer em 2012, estimam-se 10.590 casos novos de câncer da tireóide, com um risco estimado de 11 casos a cada 100 mil mulheres. O câncer da tireóide em mulheres é o terceiro mais incidente na região Norte (7/100 mil). Nas regiões Sudeste (15/100 mil) e Nordeste (6/100 mil), ocupa a quarta posição e nas regiões Sul (10/100 mil) e Centro-Oeste (6/100 mil), a quinta e sexta posições, respectivamente.³⁴

Existem muitos tipos de câncer de tireóide, que possuem diferentes características moleculares e clínicas. O carcinoma papilar da tireóide (PTC) é o mais comum e representa 80% de todos os carcinomas da tireóide, o tipo folicular representa aproximadamente 15%, o tipo medular 3% e o anaplástico 2%, mas neste tipo as células tendem a crescer e se dividir muito rapidamente, sendo muito difícil de controlar e fazendo com que se torne um dos cânceres humanos mais letal.³⁵

Embora o câncer de tireóide não seja a malignidade de maior incidência no homem, muitos mecanismos moleculares são compartilhados na carcinogênese e, a melhor compreensão destes mecanismos, independentemente do tipo histológico e tecido de origem, poderão fornecer novos alvos para terapia.

Atualmente, muitos estudos têm sido desenvolvidos para analisar o perfil de expressão dos miRNAs em carcinomas para avaliar seu papel no processo da

carcinogênese e o possível uso dos miRNAs no diagnóstico e prognóstico de neoplasias.

2.4 PROTEÍNAS HMGA E MIRNAS

O material genético presente nas células eucarióticas encontra-se empacotado numa estrutura conhecida como cromatina, que funciona como um modelo fisiológico dinâmico na regulação de vários processos nucleares, incluindo transcrição do DNA, replicação, reparo, mitose e apoptose.³⁶⁻³⁸ A unidade fundamental da cromatina é o nucleossoma que consiste em, aproximadamente, 146 pares de bases de DNA enroladas ao redor de um octâmero central de proteínas conhecidas como histonas.³⁹ As histonas são proteínas básicas pequenas que consistem de um domínio globular, em que o filamento de DNA se enrola, e de uma cauda amino-terminal flexível, que sobressai do conjunto.

Inicialmente, as proteínas histonas foram consideradas componentes meramente estruturais, que reúnem uma grande quantidade de DNA genômico em uma estrutura que pode ser facilmente acomodada pelo núcleo das células. Entretanto, atualmente, são reconhecidas pelo seu envolvimento na manutenção do equilíbrio dinâmico da cromatina.⁴⁰

A cromatina também é constituída por um segundo tipo de proteínas estruturais, não-histonas, chamadas Proteínas de Grupo de Alta Mobilidade (do inglês *High-Mobility-Group Proteins*) (HMGs). As HMGs atuam como co-fatores em processos nucleares básicos como a transcrição gênica, ligando-se à cromatina de forma reversível para alterar sua conformação e possibilitar ou facilitar a ação cooperativa com outras proteínas/enzimas que executam os referidos processos celulares de forma mais direta.⁴¹ As proteínas de grupo de alta mobilidade A (HMGA) são uma família composta por quatro proteínas: HMGA1a, HMGA1b, HMGA1c e HMGA2 (anteriormente conhecidas como HMGI, HMGY, HMG-I/R e HMGI-C, respectivamente). Elas são codificadas por dois genes distintos HMGA1a e HMGA1b. Estas proteínas ligam-se ao sulco das regiões de DNA ricas em A-T. Seu domínio de ligação com o DNA está localizado na região N-terminal da proteína e

contêm três repetições curtas de bases, os chamados "ganchos-AT" (AT-Hook).⁴² As proteínas HMGA não têm atividade transcricional, *per se*, no entanto, interagindo com a maquinaria de transcrição alteram a estrutura da cromatina e, assim, regulam, positiva ou negativamente, a atividade transcricional de vários genes.^{43,44} Em células e tecidos normais os níveis das proteínas HMGA estão baixos ou ausentes. Em contraste, em células neoplasticamente transformadas, bem como em células embrionárias, a expressão constitutiva das proteínas HMGA é excepcionalmente alta. Sua super expressão está associada principalmente com um fenótipo altamente maligno, e também representa um índice de mal prognóstico e frequentemente se correlaciona com a presença de metástase, e com uma sobrevida reduzida.¹²

Vários estudos demonstram que as proteínas HMGA desempenham um papel crucial na transformação neoplásica. O bloqueio da síntese de HMGA em camundongos impede a transformação das células da tireóide por retrovírus murinos. Igualmente, um adenovírus portador do gene HMGA1 na orientação anti-senso induz a morte celular por apoptose em linhagens celulares humanas de carcinoma anaplásico de tireóide, mas não nas células normais da tireóide.⁴⁵⁻⁴⁷

Uma propriedade importante e quase única das proteínas HMGA é que elas podem interagir diretamente com um número extraordinariamente elevado de fatores de transcrição, utilizando mais de uma interação proteína-proteína. Esses determinantes fornecem as proteínas HMGA um número notável de pontos de controle para regular a expressão de um grande número de genes-alvo. Os mecanismos de ação das proteínas HMGA estão representados na figura 3 a seguir:

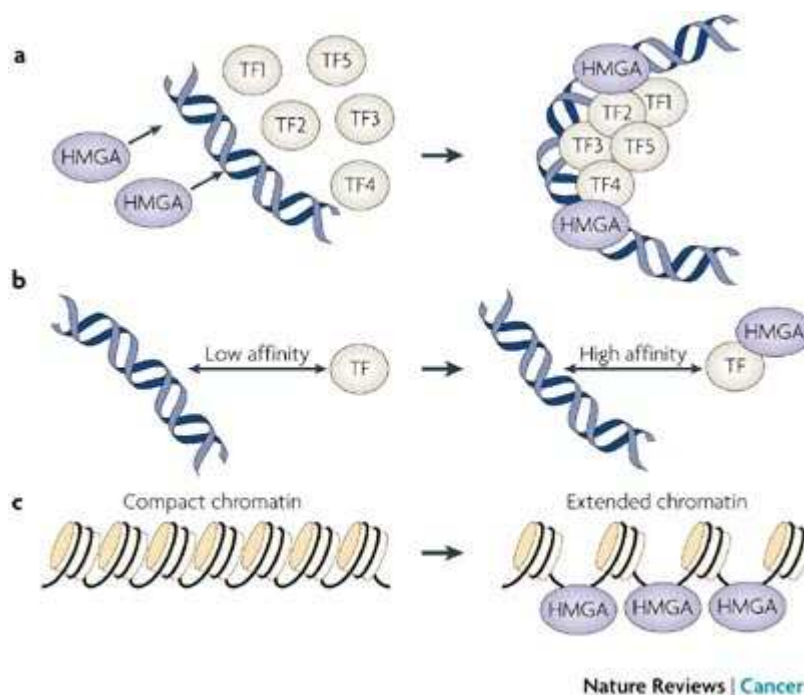


Figura 3. Mecanismo de ação das proteínas HMGA. A) Interação com o DNA e com fatores transcricionais, gerando uma multiproteína ligada ao DNA. B) Interações proteína-proteína. c) Alteram a estrutura da cromatina. Fonte: Fusco A e Fedele M, 2007.

A síntese das proteínas HMGA é regulada pelos miRNAs, no entanto as proteínas HMGA também podem regular a expressão dos miRNAs. Foi descoberto que a HMGA1 regula positivamente o miR-181 em células MCF7.⁴⁸ Este resultado parece coerente com dados publicados anteriormente que mostram o aumento da expressão do miR-181 em diversas neoplasias malignas.^{49,50}

Além disso, o miR-181 regula negativamente a expressão do gene Polycomb CBX7 (genes que codificam uma família de proteínas de remodelamento da cromatina) para o qual a perda da expressão se correlaciona com um pior prognóstico dos pacientes com câncer de cólon.⁵⁰ Portanto, além destes mecanismos de regulação discutidos acima, as proteínas HMGA podem regular a expressão dos genes com um papel crucial na carcinogênese, modulando a expressão dos miRNAs. Sendo assim é razoável supor que as proteínas HMGA1 estão envolvidas na regulação do câncer através da expressão dos miRNA.

Os miRNAs constituem uma classe de pequenos RNAs endógenos que regulam a expressão gênica. São uma abundante classe de genes regulatórios em

organismos multicelulares e modulam a expressão de muitos genes que codificam proteínas.¹⁷ A maioria dos miRNAs identificados são altamente conservados evolutivamente entre muitas espécies distantemente relacionadas (incluindo invertebrados, vertebrados e plantas), sugerindo que os miRNAs desempenham um papel importante em processos biológicos essenciais, incluindo o tempo de desenvolvimento, regulação do ciclo celular, diferenciação, sinalização, envelhecimento e câncer.⁴³

Até hoje todos os tipos de tumores analisados por perfis de miRNAs demonstraram perfis significativamente diferentes (para amadurecimento e/ou precursores de miRNAs) em comparação com as células normais do mesmo tecido. Além disso, evidências recentes indicam que os miRNAs podem ser considerados colaboradores na oncogênese e que eles podem participar como supressores tumorais clássicos ou como oncogenes.²¹

Os miR-221/222, super-regulados na tireóide e no câncer de próstata, demonstraram ter como alvo a proteína p27 (regulador negativo crítico do ciclo celular), e os camundongos que super expressam o mir-155 nas células desenvolveram proliferação de células pré-B pré-leucemicas policlonais, seguido de malignidade de células B.⁵¹ Portanto, dada a importância dos miRNAs na regulação gênica e no processo de carcinogênese, investigamos como a super expressão das proteínas HMGA1 pode contribuir para a transformação celular regulando o padrão de expressão dos miRNAs.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e caracterizar os alvos da HMGA que desempenham um papel fundamental na tumorigênese.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar os níveis de expressão das proteínas HMGA nas células tumorais e suas modificações pós-transcricionais.
 2. Analisar o perfil de expressão dos miRNAs em células de tireóide transformadas que expressam ou não as proteínas HMGA1.
 3. Avaliar os perfis de expressão dos miRNAs regulados pelas proteínas HMGA1 no processo de transformação celular.
-

4 METODOLOGIA

4.1 MIRNACHIP MICROARRAY

RNAs marcados, hibridização ao miRNA microarray e as análises do microarray foram realizadas como previamente descrito.⁵²

4.2 EXTRAÇÃO DE RNA E RT-PCR

O RNA total foi isolado das células utilizando Trizol (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Aproximadamente, 1 µg de RNA de cada amostra foi reversamente transcrito com o kit de transcrição reversa miScript (Qiagen). A qRT-PCR para os miRNAs maduros foi realizada com o kit miScript, um kit específico para quantificação e análise dos perfis de miRNAs. As análises qRT-PCR para *CCND1*, *CCND2* e *PTEN* foram realizadas como previamente descritas.⁵³ Cada reação foi realizada em triplicata. Para calcular os níveis de expressão relativa foi empregado o método $2^{-\Delta\Delta CT}$.⁵⁴ Os *primers* utilizados estão descritos no material suplementar em anexo.

4.3 LINHAGENS CELULARES E TRANSFECCÕES

As células FRTL5 foram cultivadas em meio Coon's F12 suplementado com 5% de soro e fatores de crescimento. As células FRO (linhagem humana de câncer da tireóide) foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS). Para a transfecção com os oligonucleotídeos, as células foram transfectadas

com 50 nmol/mL de pré-miRNA ou com os controles usando o reagente de transfecção siPORT Neo-FX™ (Ambion), de acordo com o protocolo do fabricante.

Para a transfecção dos plasmídeos recombinantes p-miRNA, as células foram transfectadas com 5 µg de p-miRNA precursores expressando vetores carregando miR-10b e miR-603 ou os controles (SBI System Biosciences, Mountain View, CA), usando lipofectamina 2000 (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante.

4.4 ENSAIO DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DA CROMATINA

As células FRTL5-KiMSV foram processadas para os experimentos de imunoprecipitação da cromatina (ChIP) conforme descrito.⁵⁵ As amostras foram submetidas à imunoprecipitação com anticorpos específicos anti-HMGA1 e HMGA2. Os *primers* utilizados estão descritos no material suplementar em anexo.

4.5 PLASMÍDEOS E CONSTRUTOS

A região 3'-UTR da *CCND1* e *CCND2*, incluindo os sítios de ligação para o miR-603 e a região 3'-UTR do *PTEN*, incluindo os sítios de ligação do miR-10b foram amplificadas por PCR utilizando os *primers* descritos no material suplementar em anexo. Os fragmentos amplificados foram clonados no vetor pGL3-*Control Firefly* luciferase (Promega, Madison, WI, USA) no sítio de ligação de XbaI, imediatamente *downstream* ao códon de terminação do gene da luciferase. O vetor Renilla luciferase (pRL-CMV) foi adquirido da Promega (Madison, WI, USA).

4.6 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS, WESTERN BLOTTING E ANTICORPOS

As análises pelo método de western blotting foram realizadas como previamente descrito⁴⁹ e as membranas foram incubadas com anticorpos anti-

CCND1(sc-F18, Santa Cruz), CCND2 (sc-181 Santa Cruz), PTEN (sc-7974, Santa Cruz) e γ -tubulina (sc-8035, Santa Cruz).

4.7 ENSAIO DE LUCIFERASE

Para os experimentos de luciferase repórter, as células FRTL5 foram co-transfectadas usando siPORT com o vetor de luciferase (200 ng), com o plasmídeo *Renilla* luciferase reporter (pRL-CMV; Promega) (20 ng) e com os oligonucleotídeos miRNA (50 nmol/mL). A atividade da *Renilla* e da luciferase foram avaliadas 48 horas após a transfecção através do sistema *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega, Madison, WI, USA). A atividade da luciferase foi normalizada com a atividade de *Renilla* como controle da eficiência de transfecção.

4.8 CURVAS DE CRESCIMENTO

Para a realização das curvas de crescimento, as células FRTL5 e FRO foram plaqueadas em placas de 12 poços e transfectadas com 50 nmol/mL de pré-miRNA precursor ou com o controle (Ambion, Austin, TX), usando siPORT neoFX. O número de células foi contado 24, 48, 72 e 96 horas após a transfecção.

4.9 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS

Para o ensaio de formação de colônias, as células FRTL5 foram transfectadas com 5 μ g de precursores do miR-10b e miR-603 (SBI System Biosciences), ou com o vetor controle, contendo um gene de resistência a neomicina. As células transfectadas foram selecionadas usando 1 mg/mL de neomicina diluída no meio de cultura. Após 15 dias, as células foram fixadas e coradas com 0.1% de cristal violeta e 20% de metanol e as colônias resultantes foram contadas.

4.10 CITOMETRIA DE FLUXO

Depois de tripsinizadas, as células foram lavadas uma vez com PBS e fixadas em etanol 70% por 24 horas. A coloração para o conteúdo de DNA foi realizada com 2 µg/ml de iodeto de propídeo e 20 µg/ml de RNase A por 30 minutos. Para a detecção da marcação do DNA foi empregada a técnica de citometria de fluxo com o equipamento FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA) com interface com computador Hewlett-Packard (Palo Alto, CA). Os dados do ciclo celular foram analisados com o programa CELL-FIT (Becton Dickinson).

4.11 ENSAIO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

Para o ensaio de cicatrização das feridas, as células foram plaqueadas em placas de 60 mm. Após as células atingirem confluência, as feridas foram produzidas com o auxílio de uma ponteira (p1000) estéril. As células foram lavadas com PBS e foi adicionado meio de cultura, as áreas com as feridas foram marcadas e cultivadas em meio DMEM (contendo 10% de soro fetal bovino) em atmosfera úmida a 37°C com 5% de CO₂. A distância de migração das células foi avaliada com o auxílio de um microscópio de contraste de fase em diferentes tempos.

4.12 ÉTICA

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão Científica do Instituto de Geriatria e Gerontologia (IGG) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS (CEP) (ANEXO 1).

5 RESULTADOS

5.1 PERFIL DE EXPRESSÃO DOS MIRNAS DE CÉLULAS DE TIREÓIDE NORMAL E TRANSFORMADAS

O perfil de expressão dos miRNAs nas células FRTL5 (células normais de tireóide de rato), FRTL5-KiMSV (células de tireóide de ratos transformadas com o vírus murino do sarcoma de Kirsten, expressando as proteínas HMGA1) e FRTL5-KiMSV-HMGA1as (células da tireóide de rato que não expressam HMGA1) foi determinado pela análise do miRNACHIP microarray.

Aplicando as análises estatísticas (ANOVA), obtivemos uma lista de miRNAs diferentemente expressos ($p < 0,05$) nas diferentes linhagens celulares analisadas. Trinta miRNAs encontravam-se super expressos duas vezes ou mais nas células FRTL5-KiMSV quando comparadas com as células de tireóide normais (Tabela 3). Onze miRNAs apresentaram expressão reduzida nas células FRTL5-KiMSV aproximadamente de duas vezes, em comparação com as células não infectadas (Tabela 4).

Tabela 3. miRNAs positivamente regulados nas células FRTL5-ki vs FRTL5.

	FRTL5*	FRTL5-Ki*	FRTL5-Ki-HMGA1as*	Unique id
1	280.1031015	1595.9298702	58.5380234	miR-211
2	73.5939709	1946.3039316	58.5380234	miR-221
3	408.6431883	2151.2743109	234.4708541	miR-222
4	681.9879092	862.8705086	575.8666445	miR-135a
5	60.8792876	886.1772341	79.0067003	miR-10b
6	822.2648124	1034.9552875	575.5817842	miR-125a-5p
7	58.5380234	554.0564711	366.4643405	miR-181c
8	2345.2757725	16663.5795702	864.8471708	miR-125b
9	438.3500082	2146.5560831	1915.0423375	miR-296-3p
10	697.1044181	1644.0562633	1302.4911182	miR-139-3p
11	707.4409641	1999.457069	799.0544053	miR-181a-2*
12	372.1153502	1076.8152751	804.0368436	miR-136
13	946.7022302	1690.4004014	909.1057362	miR-24
14	76.6874006	221.7257964	191.3959116	miR-30c-1*
15	5219.2525397	10419.5983292	1680.5467998	miR-23a
16	58.5380234	264.1678294	58.5380234	miR-21
17	73.1195679	244.4214859	193.946408	miR-99a
18	154.337559	390.0188225	58.2088773	miR-25
19	218.424279	1612.9996976	739.5993112	miR-10a
20	675.7057813	983.1501574	722.1672157	miR-31
21	128.866498	443.7987304	120.7775502	miR-29b
22	71.0230958	357.9657789	250.3728592	miR-345
23	643.7278191	781.2730488	191.9130308	miR-191*
24	68.4715993	256.4252354	83.0545357	miR-19a
25	2817.59766	6045.0485854	3805.9202533	miR-92a
26	79.9056953	238.4870808	168.9075747	miR-154
27	1055.6938719	1515.2413967	1056.8644699	miR-219-2-3p
28	110.8374531	842.301297	703.1372825	miR-548a-3p
27	161.2776146	900.4412948	82.6132426	miR-563
30	346.4019254	747.2039031	557.4334893	let-7e

Note: * os valores indicam a média geométrica das intensidades de fluorescência.
Genes com significância de 0,05 no teste univariado.

Tabela 4. miRNAs negativamente regulados nas células FRTL5-ki vs FRTL5.

	FRTL5*	FRTL5-Ki*	FRTL5-Ki-HMGA1as *	Unique id
1	1599.7312207	668.3778225	731.0884692	miR-129-3p
2	1118.3268735	653.3083176	912.8465266	miR-595
3	1894.213173	1055.631416	1367.2495312	miR-191
4	2863.5463995	1926.8172024	3211.5447107	miR-589
5	133.3676227	76.488397	295.5620751	miR-583
6	1448.953761	1041.4575446	1346.3562923	miR-370
7	20378.1155961	15386.6688822	26007.4430165	miR-766
8	11095.946331	5272.941518	6396.9011842	miR-133b
9	90.8431762	58.5380234	90.9180302	miR-660
10	149.7864931	58.5380234	160.050953	miR-603
11	291.5533059	91.1295579	103.2299827	miR-34a

Note: * os valores indicam a média geométrica das intensidades de fluorescência
Genes com significância de 0,05 no teste univariado.

Entre estes genes regulados pela transformação celular, o miR-10b, miR-21, miR-125b, miR-221 and miR-222 demonstraram-se positivamente regulados enquanto o miR-34a e o miR-603 encontravam-se negativamente regulados pela expressão de HMGA. Subsequentemente, os resultados obtidos por meio do miRNACHIP foram validados, avaliando a expressão dos miRs 10b, 21, 125b, 221, 222, 603 e 34a utilizando a técnica de RT-PCR (figura 4).

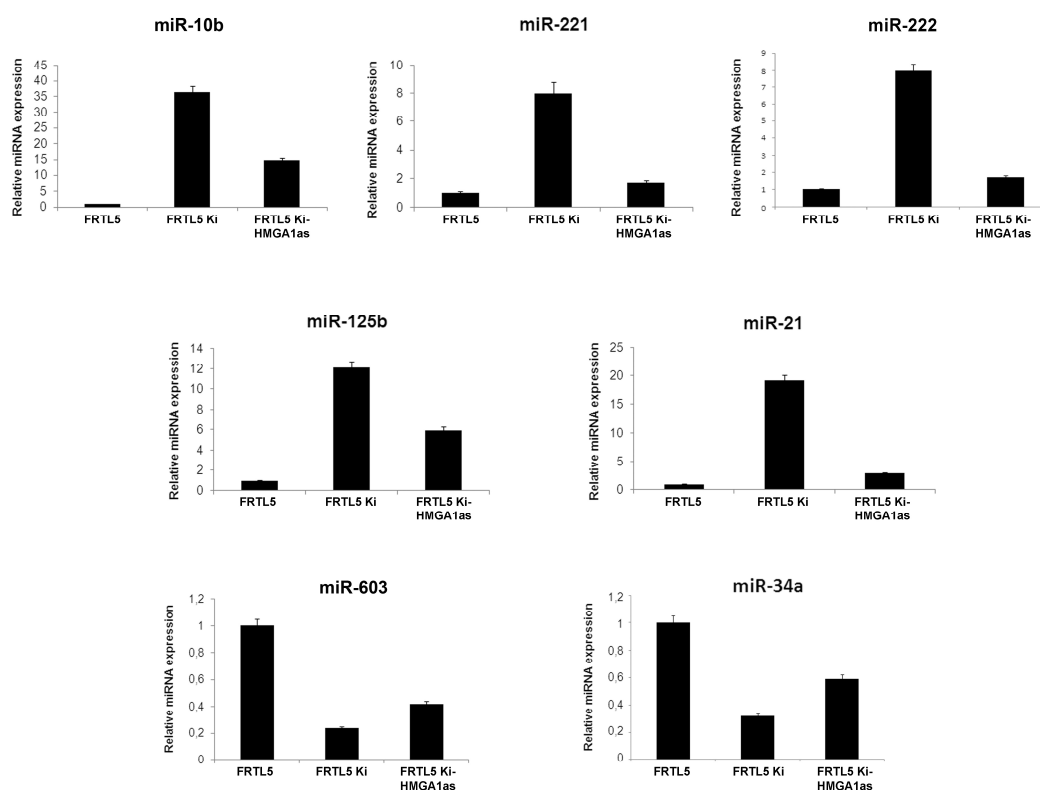


Figura 4. Validação do microarray por RT-PCR. Análise através de qRT-PCR do miR-10b, miR-221, miR-222, miR-125b, miR-21, miR-603 e miR-34a foi realizada em células FRTL5, FRTL5-KiMSV e FRTL5-KiMSV-HMGA1as. Os valores de expressão indicam a alteração relativa nos níveis de expressão entre FRTL5 e FRTL5-KiMSV, assumindo que o valor médio das amostras normais era igual a 1.

Após investigamos se a dependência da expressão de HMGA de alguns miRNAs era restrita às células de tireóide transformadas ou se era um evento mais geral, analisando sua expressão em uma linhagem de células de câncer de mama (MCF7), transfectadas com *HMGA1* (MCF7-HMGA1) ou *wild type*, e em fibroblastos embrionários de camundongos (MEFs) *null* para *hmg1* com seu controle *wild type*.

Como mostra a figura 5, o miR-10b era muito mais expresso em MCF7-HMGA1 em relação seu controle MCF7 *wild type* e menos expresso em MEFs *null* para *hmg1* em comparação com seu controle *wild type*. Já o miR-603 apresentou o comportamento contrário, sendo menos expresso em MCF7-HMGA1 e em MEFs *wild type* em comparação com MCF *wild type* e MEFs *hmg1 null*. Contrariamente o

miR-21, miR-125b, miR-221, miR-222 e o miR-34a não apresentaram diferenças significativas em MEFs ou MCF7, com ou sem expressão das proteínas HMGA.

Com base nesses dados, as investigações foram direcionadas para os miR-10b e miR-603 pois sua expressão é seguramente, dependente das proteínas HMGA em mais de um sistema celular.

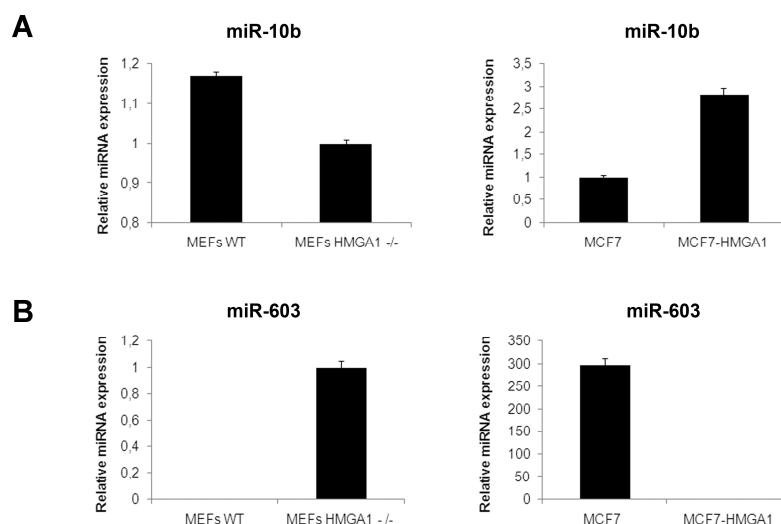


Figura 5. Expressão do miR-10b e miR-603 em células MCF-7 transfectadas com HMGA1 e MCF7 wild type e MEFs *hmg1*^{-/-} e wild type. Os valores de expressão indicam a mudança relativa nos níveis de expressão entre MEF *wild type* e MEF *hmg1*^{-/-}, MCF7 *wild type* e MCF7-HMGA1, assumindo que o valor médio das amostras *wild type* era igual a 1. Cada barra representa a média \pm e.p. a partir de três experimentos independentes realizados em triplicata.

5.2 AS PROTEÍNAS HMGA1 SE LIGAM À REGIÃO *UPSTREAM* DO MIR-10B E DO MIR-603

Foi investigado se as proteínas HMGA1 se ligam diretamente às regiões reguladoras do miR-10b e do miR-603. Considerando que as proteínas HMGA se ligam ao DNA nas regiões ricas em A-T, por meio dos seus domínios “AT-hooks”,^{42,43} procuramos a presença de sítios de ligação para HMGA1 em uma região de 2.000 pb *upstream* ao miR-10b e do miR-603. Para isso, foi empregado o ensaio de

imunoprecipitação da cromatina (ChIP) para determinar se as proteínas HMGA1 poderiam se ligar a estas sequências. Com este objetivo a cromatina de células FRTL5-KiMSV foi imunoprecipitada com anticorpos anti-HMGA1 e anti-HMGA2. O DNA imunoprecipitado foi então analisado por meio da técnica da PCR semi-quantitativa usando *primers* (descritos no material suplementar em anexo) que cobrem todos os sítios de ligação.

Foi observada uma amplificação da região correspondente a região *upstream* do miR-10b e do miR-603 nas células FRTL5-KiMSV imunoprecipitadas com anticorpos anti-HMGA1 e HMGA2, nenhuma amplificação foi detectada nos controles negativos (figura 6). Isto demonstra que a ligação é específica para a região *upstream* do miR-10b e do miR-603. Portanto, estes resultados indicam que as proteínas HMGA1 e HMGA2 são capazes de se ligar *in vivo* a região localizada *upstream* do miR-10b e do miR-603 que provavelmente tem funções reguladoras.

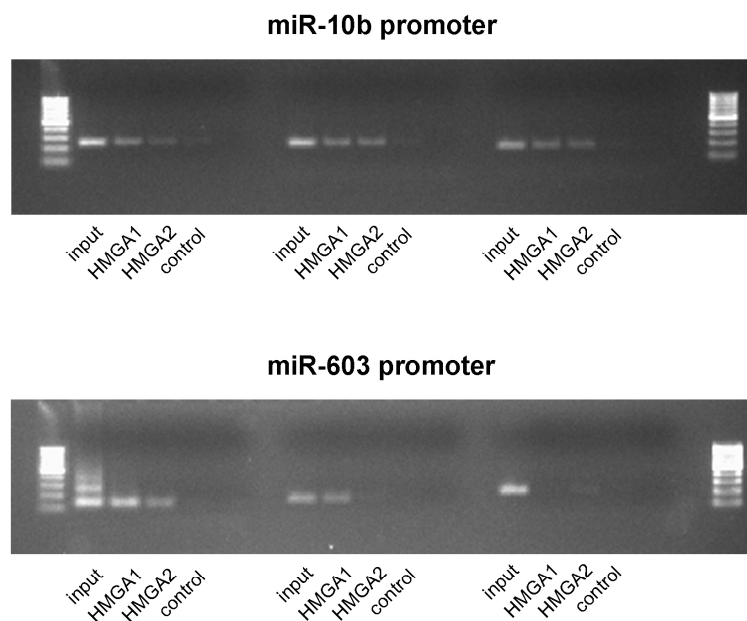


Figura 6. HMGA1 e HMGA2 se ligam a região *upstream* do miR-10b e do miR-603. A cromatina das células FRTL5-KiMSV foi imunoprecipitada com anticorpos anti-HMGA1 and anti-HMGA2 e analisada por PCR. O Input e o DNA imunoprecipitado foram analisados por PCR usando *primers* específicos para a região *upstream* do miR-10b e do miR-603.

5.3 CCND1 E CCND2 SÃO ALVOS DO MIR-603

Uma vez que os miRNAs são capazes de modular a expressão do gene tendo como alvo mRNAs, utilizamos ferramentas de bioinformática (Target Scan, mirGen e Miranda) para procurar por alvos do miR-603. Foram encontrados muitos alvos envolvidos em diversos processos biológicos, mas este estudo dedicou-se a ciclina D1 (CCND1) que têm sido mencionada como um gene chave que controla o ciclo celular e frequentemente, encontra-se super expresso em células cancerosas, contribuindo para a proliferação e migração celular, e ao gene da ciclina D2 (CCND2) que tem um papel muito importante na transição G1/S do ciclo celular.⁵⁷

Os locais que correspondem à “sequência semente” do miR-603 foram previstos para ambas as sequências 3'UTR destes genes (Figura 7A). Para validar a influência do miR-603 sobre os alvos, os oligonucleotídeos de pré-miR-603 foram transfectados em células FRTL5, os níveis das proteínas CCND1 e CCND2 produzidas foi determinado pelo método de western blotting. Após a transfecção com o miR-603, foi observada uma redução evidente nos níveis das proteínas CCND1 e CCND2 quando comparado com o controle (Figura 7B). Nenhuma alteração nos níveis de mRNA *CCND1* e *CCND2* foram detectados após a transfecção com miR-603 em relação ao controle ou com as células não transfectadas (Figura 7C). Este resultado valida uma regulação pós-transcricional das proteínas CCND1 e CCND2 pelo miR-603 e exclui seu papel na degradação do mRNA de *CCND1* e *CCND2*.

Para demonstrar que a interação direta entre os miRNAs analisados e os mRNAs da *CCND1* e *CCND2* foi responsável pela redução do nível de proteína, a região 3'-UTR de *CCND1* e *CCND2* incluindo os sítios de ligação do miR-603 foi inserida abaixo da região da ORF da luciferase. A atividade da luciferase foi medida após 48 horas, e foi significativamente reduzida após a transfecção com miR-603 em comparação com o controle ou com as células não transfectadas (Figura 7D), indicando que a redução da expressão das proteínas CCND1 e CCND2 pelo miR-603 é dependente da sua de ligação direta à região 3'-UTR.

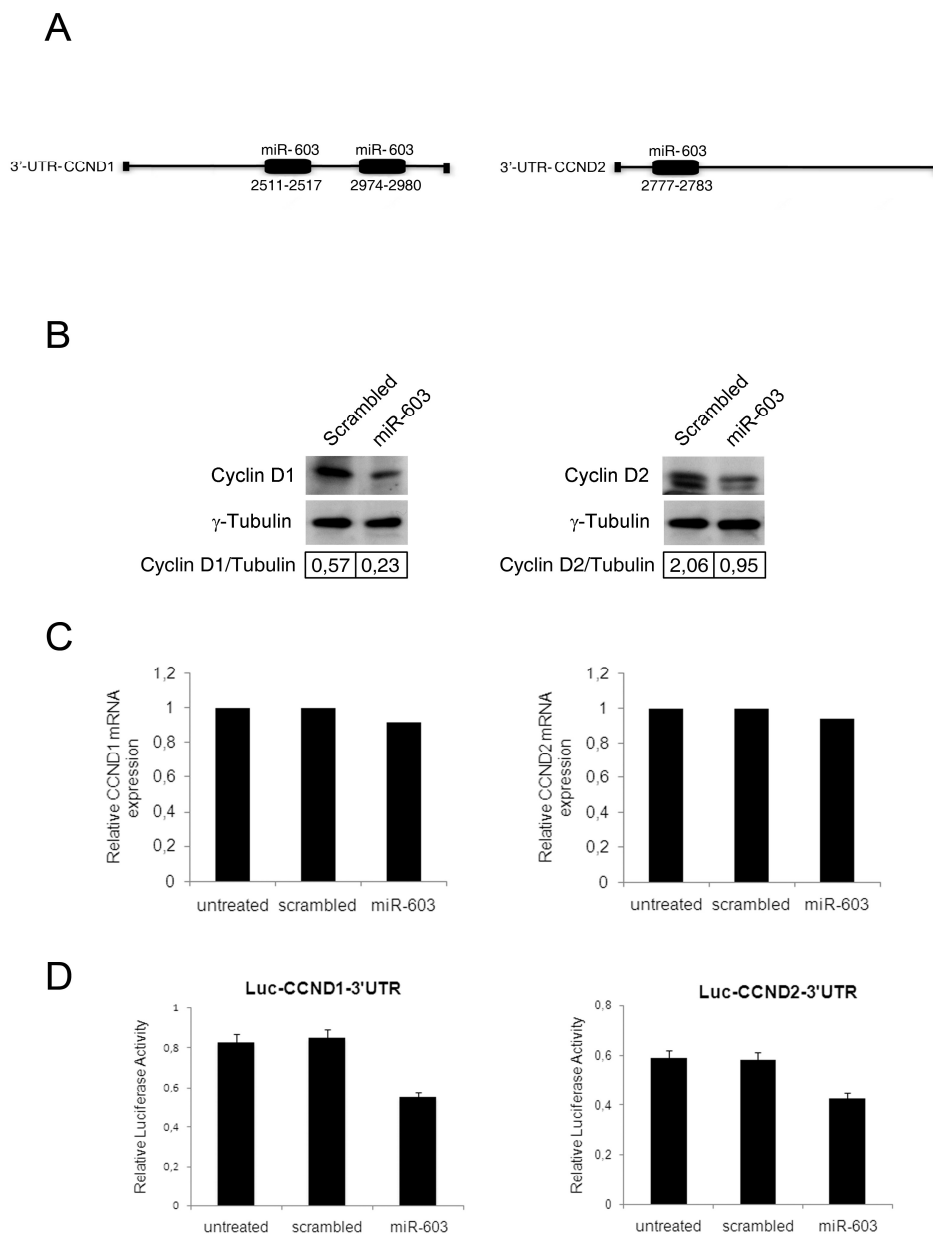


Figura 7. CCND1 e da CCND2 são alvos do miR-603. (A) Representação esquemática das regiões 3'-UTR do gene *CCND1* e *CCND2* alvos do miR-603. (B) Western blotting dos níveis da proteína ciclina D1 em células FRTL5 transfectadas com miR-603 e com o controle (painel da esquerda) e análise de Western blotting dos níveis da proteína CCND2 em células FRTL5 transfectadas com o miR-603 e com o controle (painel da direita). A expressão da γ -tubulina foi usada como controle. A análise densitométrica foi realizada usando software ImageJ e normalizando a γ -tubulina. (C) Análise qRT-PCR do mRNA da *CCND1* (painel da esquerda) e da *CCND2* (painel da direita). Os valores de expressão relativos indicam a alteração nos níveis de expressão do mRNA da *CCND1* e da *CCND2* entre células tratadas com miRNAs ou não tratadas em comparação com controle, e normalizadas com G6PD. (D) Atividade relativa da luciferase em células FRTL5 transfectadas transientemente com Luc-CCND1-3'UTR (painel da esquerda) ou Luc-CCND2-3'UTR (painel da direita) em comparação com o controle ou com as células não transfectadas.

5.4 PTEN É ALVO DO MIR-10b

Também para o miR-10b as análises bioinformáticas previram diferentes alvos, no entanto, alguns deles já haviam sido validados em estudos prévios.^{58,59} Entre os genes alvos encontrados, o gene PTEN foi investigado no presente estudo. O PTEN é um importante supressor tumoral, cuja expressão é frequentemente alterada em uma ampla gama de cânceres humanos.⁶⁰ Entretanto estudos recentes demonstraram que as alterações sutis nos níveis de PTEN podem levar a iniciação e progressão do tumor *in vivo*.⁶¹⁻⁶³ Além disso, o PTEN parece ser regulado por muitos miRNAs.⁶⁴

Para avaliar a influência do miR-10b na síntese da proteína PTEN, as células FRTL5 foram transfectadas com oligonucleotídeos pre-miR-10b, e procuramos por mudanças nos níveis da proteínas PTEN através do método de western blotting. A introdução do miR-10b nas células FRTL5 reduziu os níveis da proteína PTEN quando comparada as células transfectadas com o controle (figura 8B). A análise dos níveis de mRNA de *PTEN* após a transfecção com miR-10b não demonstrou mudanças significativas em relação ao controle ou as células não transfectadas, indicando que o miR-10b regula os níveis de produção da proteína PTEN agindo a nível pós-transcricional (figura 8C). Finalmente, para demonstrar que a interação direta entre miR-10b e mRNA de *PTEN* foi responsável pela redução na produção da proteína, a região 3'-UTR de PTEN incluindo os sítios de ligação para o miR-10b foi inserido abaixo da ORF da luciferase. A atividade da luciferase foi avaliada 48 horas após e estava significativamente reduzida após a transfecção com miR-10b quando comparado as células transfectadas com o controle ou as células não transfectadas (figura 8D), indicando que a redução nos níveis de expressão da proteína PTEN pelo miR-10b foi dependente da sua ligação direta a região 3'-UTR.

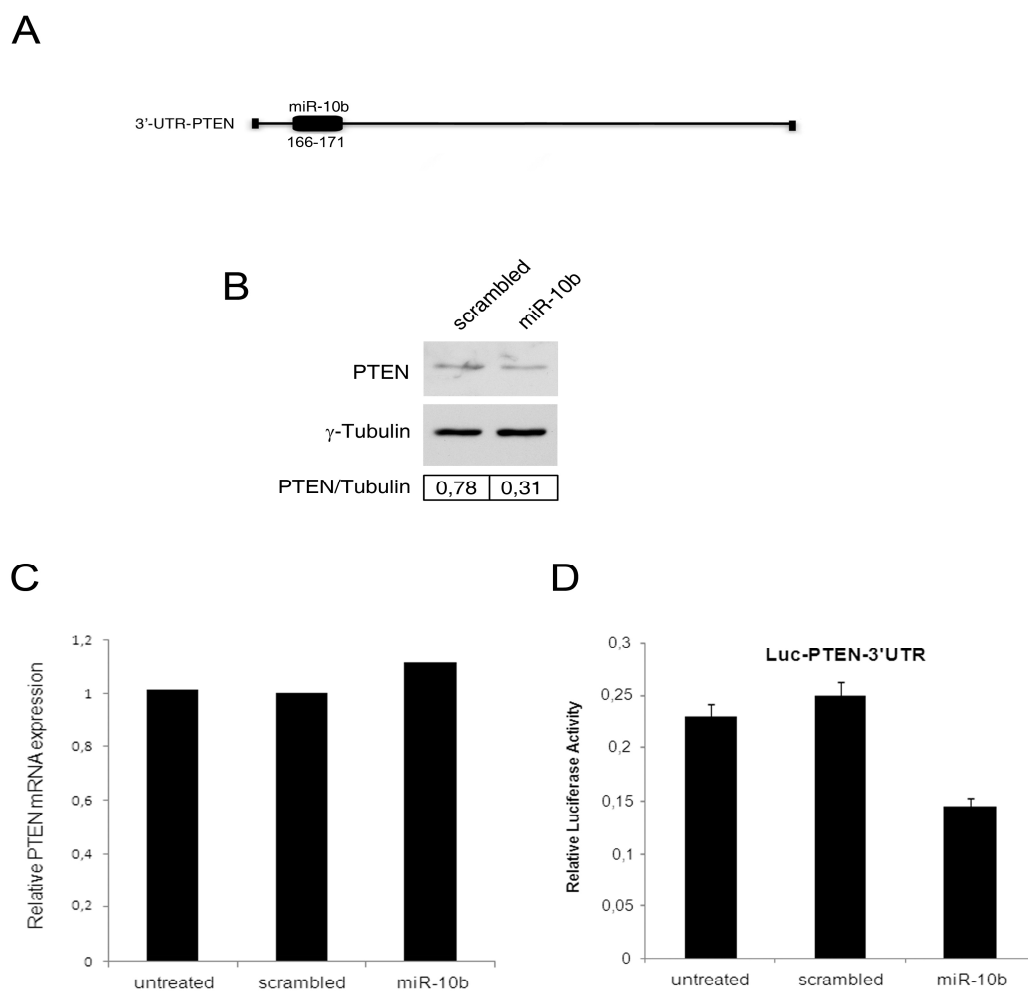


Figura 8. PTEN é alvo do miR-10b. (A) Representação esquemática da região 3'-UTR do gene PTEN alvo do miR-10b. (B) Western blotting da expressão da proteína PTEN em células FRTL5 transfectadas com miR-10b e com controle. A expressão da γ -tubulina foi usada como controle de carregamento. A análise densitométrica foi realizada usando software ImageJ e normalizando a γ -tubulina. (C) Análise qRT-PCR do mRNA de *PTEN*. Valores de expressão relativos indicam a mudança relativa nos níveis de mRNA de *PTEN* em comparação com o controle ou com as células não-tratadas, normalizados com G6PD. (D) A atividade relativa da luciferase em células FRTL5 transfectadas transientemente com Luc-PTEN-3'UTR juntamente com miR-10b ou células não transfectadas em comparação com o controle.

5.5 A EXPRESSÃO DO MIR-10B E DO MIR-603 AFETA A PROLIFERAÇÃO CELULAR DE MANEIRA ANTAGÔNICA

O efeito do miR-10b e do miR-603 na proliferação celular foi investigado na tentativa de melhor compreender seu papel na transformação das células tireóideas. Para tanto, foi realizada uma curva de crescimento nas células FRTL5 não

transfectadas ou transientemente transfectadas com o miR-10b e o miR-603, ou com o controle. A figura 9A, mostra uma clara redução no número de células 96 horas após transfecção com o miR-603 comparado com as células não transfectadas ou com o controle. Contrariamente, um aumento significativo no número de células foi observado após a transfecção com miR-10b quando comparado com as células não transfectadas ou com o controle. Resultados semelhantes foram observados quando células de tumor anaplástico da tireóide (FRO) foram transfectadas com os mesmos miRNAs ou com o controle (figura 9B).

O ensaio de formação de colônias nas células FRTL5 foi realizado após transfecção com vetores carregando os precursores do miR-10b e do miR-603, ou com o vetor vazio, contendo um gene de resistência a neomicina. Como mostra a figura 9C e de acordo com os resultados obtidos na curva de crescimento, as células transfectadas com o vetor que expressa o miR-10b produziram um maior número de colônias em comparação com aquelas transfectadas com o vetor vazio, enquanto as células transfectadas com o miR-603 geraram um menor número de colônias em comparação ao controle.

Finalmente, para melhor entender os efeitos dos miRNAs analisados, na progressão do ciclo celular, as células FRTL5 foram transfectadas com precursores dos miRNAs ou com o controle e analisadas por citometria de fluxo.

Como mostra a Figura 9D, as células transfectadas com miR-10b mostraram uma redução na população de células em fase G1 e um aumento na população de células em fase S, comparado com o controle ou com as células não transfectadas, enquanto as células transfectadas com miR-603 mostraram um aumento na população de células em G1 e uma redução no número de células em fase S. Estes resultados indicam que a super expressão destes miRNAs afeta a transição G1/S no ciclo celular.

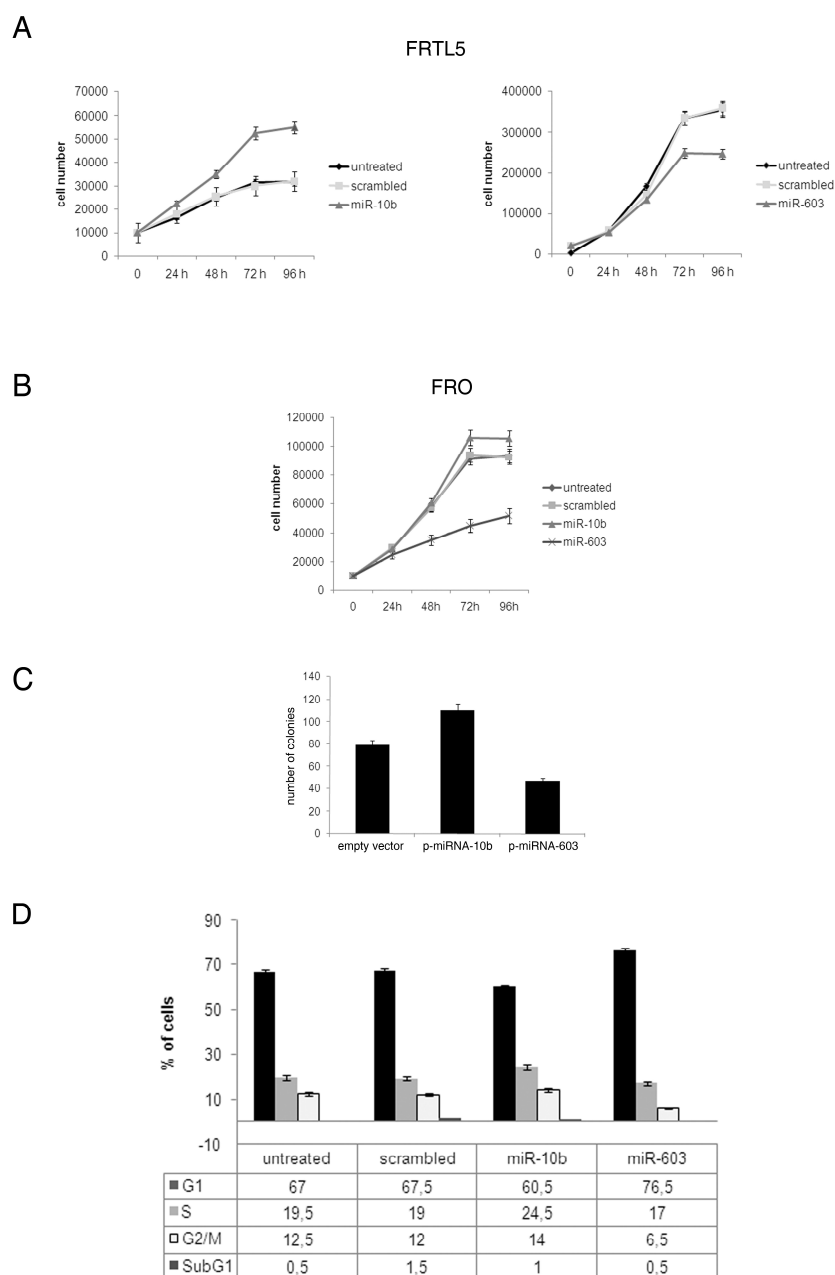


Figura 9. Efeitos do miR-10B e miR-603 na proliferação e migração celular. (A) As curvas de crescimento das células FRTL5 transfectadas com o miR-10b (painel da esquerda) e miR-603 (painel da direita) em comparação com as células não transfectadas e com o controle. As células foram plaqueadas em placas de 24 poços, foram utilizadas 1×10^4 células /poço. As células foram contadas a cada 24 horas durante 96 horas após o plaqueamento. O eixo Y representa a contagem absoluta de células viáveis. Os valores médios \pm e.p. aqui relatados derivam de três experimentos independentes realizados em duplicata. (B) Curva de crescimento de células FRO transfectadas com miR-10b e miR-603 em comparação com as células não transfectadas ou com o controle. Os valores médios \pm e.p. derivam de três experimentos independentes realizados em duplicata. (C) Ensaio de formação de colônias realizado em células FRTL5 transfectadas com um vetor expressando o miR-10b ou miR-603 sob o controle transcricional do promotor de CMV. O vetor vazio foi utilizado como controle. (D) A análise por citometria de fluxo das células FRTL5 transfectadas com o miR-10b e o miR-603 ou com o controle. Cada barra representa a média \pm e.p. de três experimentos independentes realizados em triplicata. O percentual de células em cada fase (G1,S,G2/M, subG1) está apresentado na tabela.

5.6 A EXPRESSÃO DO MIR-10B E DO MIR-603 AFETA A MIGRAÇÃO CELULAR

Para avaliar o papel do miR-10b e do miR-603 na migração celular foi realizado um ensaio de cicatrização de feridas, em células FRO estavelmente transfectadas com p-miR-10b e com p-miR-603. Uma diferença significativa na migração celular foi observada, sob microscópio de contraste de fase, 15 horas após a realização ferida.

Como mostra a figura 10, o fechamento da ferida foi quase completo após 15 horas nas células transfectadas com o miR-10b. Contrariamente o fechamento da ferida ocorreu somente após 24 horas nas células transfectadas como miR-603. Portanto, estes resultados demonstram que o miR-603 reduz a migração de células cancerosas da tireóide enquanto que o miR-10b tem um comportamento oposto, aumentando a migração dessas células.

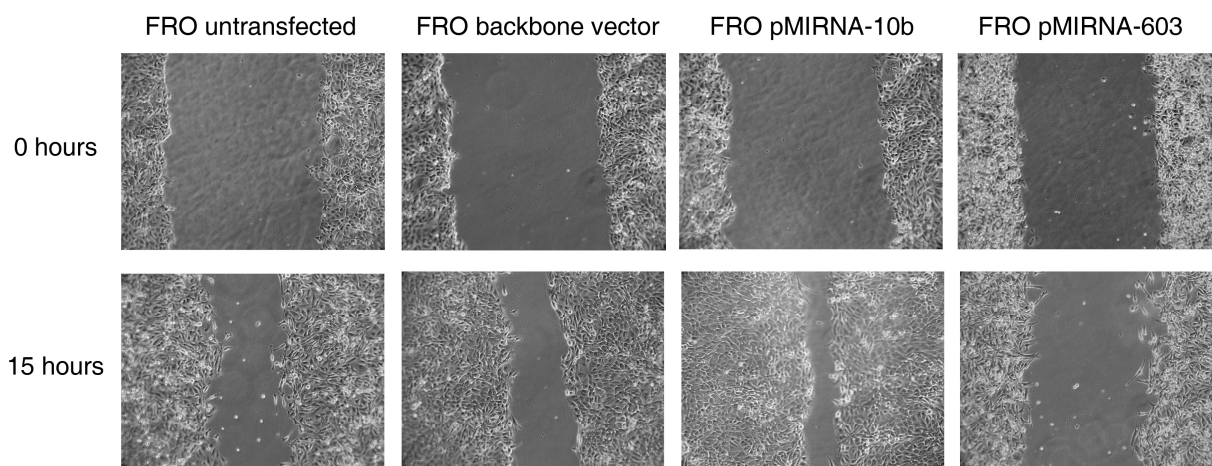


Figura 10. Papel do miR-10b e do miR-603 na migração celular. Células FRO não transfectadas e transfectadas estavelmente com p-miR-10b, miR-603 ou vetor vazio foram plaqueadas em igual densidade em placas de seis poços e cultivadas até à confluência. Uma ferida uniforme foi realizada em cada cultura confluyente e o fechamento da ferida foi avaliado sob microscópio de contraste de fase. As fotografias foram tiradas nos períodos de 0 e 15 horas após a transfecção.

6 DISCUSSÃO

A super expressão da proteína HMGA é uma característica de neoplasias malignas e tem um papel fundamental na transformação celular modulando a transcrição de um grande número de genes que têm um papel essencial na progressão da carcinogênese. As proteínas HMGA exercem suas atividades oncogênicas através de diferentes mecanismos: indução de E2F1,⁶⁵ atividade da AP1,⁶⁶ indução da ciclina A,⁶⁷ inativação da indução da apoptose pela p53^{55,68} modulação da expressão gênica e de genes envolvidos na transição epitelial-mesenquimal.^{69,70} Desde o aparecimento dos miRNAs como importantes reguladores da expressão gênica muitos estudos demonstraram que a desregulação da sua expressão pode estar envolvida no processo de carcinogênese, nosso objetivo foi identificar os miRNAs cuja expressão é dependente da expressão da proteína HMGA e então definir seu papel na transformação celular. Para este propósito utilizamos uma linhagem de células epiteliais (que representa o tipo celular a partir do qual tem origem a maioria das neoplasias malignas) onde a transformação maligna é inibida pela supressão da expressão da proteína HMGA através de metodologia anti-senso. Portanto, realizamos o perfil de expressão dos miRNAs em células normais, células de tireóide de rato transformadas com *v-ras-ki* e transformadas com *v-ras-ki* carregando um construto HMGA1 anti-senso.

A análise deste experimento demonstrou a presença de muitos miRNAs cuja expressão depende da expressão de *v-ras-ki*, entre eles, sete miRNAs são modulados pela expressão das proteínas HMGA. É digno de nota que entre os miRNAs super expressos em células transformadas com *v-ras-ki*, encontramos o miR-221 e o miR-21 que têm sido descritos como positivamente regulados em muitos carcinomas humanos.^{71,72}

Entre os miRNAs dependentes da HMGA decidimos focar a atenção no miR-10b e no miR-603, visto que observamos que a sua expressão foi dependente da expressão da HMGA também em MEFs wt e *null* para *hmga1*, e em células MCF7

expressando ou não a proteína HMGA1. Primeiramente, demonstramos que a regulação do miR-10b e do miR-603 pelas proteínas HMGA é direta, porque a CHIP demonstrou que tanto HMGA1 como HMGA2 são capazes de se ligar a região *upstream* destes miRNAs. Depois identificamos os alvos destes miRNAs: A *CCND1* e a *CCND2* são alvos do miR-603 e *PTEN* é alvo do miR-10b.

Estes miRNAs têm uma sequência correspondente na região 3'UTR dos genes alvo identificados, e a sua expressão intensificada aumenta os níveis das proteínas codificadas pelos genes alvo. Este efeito parece ser devido à inibição do processo de tradução, visto que não foram observadas mudanças significativas nos níveis de mRNA da *CCND1*, *CCND2* e *PTEN* após o tratamento com o miR-10b ou com o miR-603.

Os estudos funcionais validam o papel da regulação destes miRNAs na transformação celular. A expressão intensificada do miR-10b aumenta a migração celular, promove a proliferação devido a uma diminuição da população celular na fase G1 do ciclo celular. Por outro lado o efeito oposto é alcançado quando as células são transfectadas com o miR-603.

7 CONCLUSÕES

Vários estudos têm mostrado a desregulação da expressão dos miRNAs em carcinomas da tireóide humana, e estudos funcionais corroboram o papel crítico destes miRNAs no desenvolvimento carcinoma da tireóide.

Este estudo fornece um novo mecanismo através do qual as proteínas HMGA contribuem para a transformação de células malignas e sugere diferentes abordagens para a terapia contra o câncer baseada no bloqueio da função das proteínas HMGA. Na verdade isto é possível por meio da atuação direta nas proteínas HMGA, ou aumentando os níveis dos miRNAs que tem como alvo HMGA,^{49,63} ou modificando a expressão ectópica dos miRNAs modulados pelas proteínas HMGA.

O perfil de expressão destes miRNAs juntamente com o seu papel biológico sugere uma correlação com o diagnóstico, prognóstico e novas abordagens terapêuticas.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Desde a descrição original, das proteínas HMGA, há 25 anos, diferentes estudos vem demonstrando que elas possuem um papel fundamental no processo da carcinogênese, e que sua presença em amostras de tumores é um marcador de mal prognóstico para a maioria dos carcinomas humanos.

Visto que a expressão diferencial da proteína HMGA em células neoplásicas e normais permite maior especificidade e menor toxicidade na terapia e que as proteínas HMGA são super expressas em cânceres de diferentes origens, a terapia baseada em HMGA pode ter uma ampla gama de aplicações.

Já os miRNAs desempenham papéis importantes na resposta celular a agentes cancerígenos e genotóxicos. O perfil de expressão alterado dos miRNAs está associado ao processo de carcinogênese, tendo implicações no diagnóstico e prognóstico de diferentes tipos de câncer. Os miRNAs podem influenciar as respostas ao tratamento e a cura de tumores, demonstrando que seu papel como agente terapêutico anticâncer é promissor e no futuro podem servir como biomarcadores para a detecção precoce de tumores.

9 PERSPECTIVAS

O desafio atual é identificar diferentes alvos que são regulados pelos miRNAs. Traduzir toda esta informação em estratégias terapêuticas que beneficiem pacientes com tumores com super expressão das proteínas HMGA e assim desenvolver novas terapias contra o câncer inibindo as proteínas HMGA.

9 REFERÊNCIAS

1. Berg, JM Tymoczko JL and SL. Biochemistry. 5th ed. 2002.
 2. Hekimi S, Guarente L. Genetics and the specificity of the aging process. *Science (New York, N.Y.)* [Internet]. 2003 Feb 28 [cited 2012 Jul 5];299(5611):1351–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12610295>
 3. Guarente L, Kenyon C. Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature* [Internet]. 2000 Nov 9 [cited 2012 Apr 16];408(6809):255–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11089983>
 4. Subramanian D, Griffith JD. Interactions between p53 , hMSH2 – hMSH6 and HMG I (Y) on Holliday junctions and bulged bases. 2002;30(11):2427–34.
 5. Baldassarre G, Battista S, Belletti B, Thakur S, Pentimalli F, Trapasso F, et al. Negative Regulation of BRCA1 Gene Expression by HMGA1 Proteins Accounts for the Reduced BRCA1 Protein Levels in Sporadic Breast Carcinoma. 2003;23(7):2225–38.
 6. Fedele M, Fusco A. HMGA and cancer. *Biochimica et biophysica acta* [Internet]. 2010 [cited 2012 Mar 19];1799(1-2):48–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20123067>
 7. Masciullo V, Baldassarre G, Pentimalli F, Berlingieri MT, Boccia A, Chiappetta G, et al. HMGA1 protein over-expression is a frequent feature of epithelial ovarian carcinomas. *Carcinogenesis* [Internet]. 2003 Jul [cited 2012 Jun 27];24(7):1191–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12807722>
 8. Bandiera A, Bonifacio D, Manfioletti G, Mantovani F, Rustighi A, Zanconati F, et al. Expression of HMGI (Y) Proteins in Squamous Intraepithelial and Invasive Lesions of the Uterine Cervix Expression of HMGI (Y) Proteins in Squamous Intraepithelial and Invasive Lesions of the Uterine Cervix1. 1998;:426–31.
 9. Tamimi Y, van der Poel HG, Denyn MM, Umbas R, Karthaus HF, Debruyne FM, et al. Increased expression of high mobility group protein I(Y) in high grade prostatic cancer determined by in situ hybridization. *Cancer research* [Internet]. 1993 Nov 15;53(22):5512–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8221692>
-

-
10. Miyazawa J. Expression of Mesenchyme-Specific Gene HMGA2 in Squamous Cell Carcinomas of the Oral Cavity. *Cancer Research* [Internet]. 2004 Mar 15 [cited 2012 Jun 28];64(6):2024–9. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-03-1855>
 11. Rho YS, Lim YC, Park IS, Kim JH, Ahn HY, Cho SJ, et al. High mobility group HMGI(Y) protein expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Acta oto-laryngologica* [Internet]. 2007 Jan [cited 2012 Jul 6];127(1):76–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17364334>
 12. Fusco A, Fedele M. Roles of HMGA proteins in cancer. *Nature reviews. Cancer* [Internet]. 2007 Dec [cited 2012 Mar 21];7(12):899–910. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18004397>
 13. Liao S-S, Jazag a, Ito K, Whang EE. Overexpression of HMGA1 promotes anoikis resistance and constitutive Akt activation in pancreatic adenocarcinoma cells. *British journal of cancer* [Internet]. 2007 Mar 26 [cited 2012 Jun 28];96(6):993–1000. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2360112&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 14. Wood LJ, Maher JF, Bunton TE, Resar LMS. The Oncogenic Properties of the HMG-I Gene Family The Oncogenic Properties of the HMG-I Gene Family 1. 2000;:4256–61.
 15. Baldassarre G, Fedele M, Battista S, Vecchione a, Klein-Szanto a J, Santoro M, et al. Onset of natural killer cell lymphomas in transgenic mice carrying a truncated HMGI-C gene by the chronic stimulation of the IL-2 and IL-15 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet]. 2001 Jul 3;98(14):7970–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=35452&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 16. Fedele M, Pentimalli F, Baldassarre G, Battista S, Klein-Szanto AJP, Kenyon L, et al. Transgenic mice overexpressing the wild-type form of the HMGA1 gene develop mixed growth hormone/prolactin cell pituitary adenomas and natural killer cell lymphomas. *Oncogene* [Internet]. 2005 May 12 [cited 2012 Jun 28];24(21):3427–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15735694>
 17. Bartel DP, Lee R, Feinbaum R. MicroRNAs: Genomics , Biogenesis , Mechanism , and Function *Genomics : The miRNA Genes*. 2004;116:281–97.
 18. Miska E a. How microRNAs control cell division, differentiation and death. *Current opinion in genetics & development* [Internet]. 2005 Oct [cited 2012 Mar 27];15(5):563–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16099643>
-

-
19. Zamore PD, Haley B. Ribo-gnome: the big world of small RNAs. *Science (New York, N.Y.)* [Internet]. 2005 Sep 2 [cited 2012 Mar 13];309(5740):1519–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16141061>
 20. Fabbri M, Croce CM, Calin GA. MicroRNAs. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)* [Internet]. [cited 2012 Jul 6];14(1):1–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18303474>
 21. Vandenberg TC, Li Y, Philip PA, Sarkar FH. MicroRNA and Cancer: Tiny Molecules with Major Implications. *Current genomics* [Internet]. 2008 Apr;9(2):97–109. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2674802&tool=pmc.ncbi.nlm.nih.gov&rendertype=abstract>
 22. IBGE Censo 2010 [Internet]. Available from: http://www.ibge.gov.br/censo2010/resultados_do_censo2010.php
 23. GM C. *The Cell: A Molecular Approach*. second edi. USA: 2000.
 24. Massion PP, Carbone DP. The molecular basis of lung cancer: molecular abnormalities and therapeutic implications. *Respiratory research* [Internet]. 2003 Jan [cited 2012 Jul 11];4:12. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=314397&tool=pmc.ncbi.nlm.nih.gov&rendertype=abstract>
 25. Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* [Internet]. 1989 May 4 [cited 2012 Jul 11];339(6219):58–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2469964>
 26. Harvey Lodish, Arnold Berk, Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore and JD. *Molecular Cell Biology*. 2000.
 27. Nestor Schor, Mirian Aparecida Boim OFP dos S. *Bases Moleculares da Biologia, da Genética e da Farmacologia*. 2008.
 28. Society AC. *Cancer facts & figures*. 2008 [cited 2012 Jul 6]; Available from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Cancer+Facts+%&+Figures#0>
 29. Guerra MR, Gallo CV de M, Mendonça GA e S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2005;51(3):227–34.
 30. Guerra MR, Vitória C, Gallo DM, Azevedo G. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes The risk of cancer in Brazil: tendencies and recent epidemiologic studies. 51(3):227–34.
 31. Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based
-

-
- study. *The Lancet Oncology* [Internet]. 2012 May [cited 2012 Jun 4];2045(12):1–12. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204512702115>
32. Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* [Internet]. 2010 Aug [cited 2012 Mar 9];19(8):1893–907. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20647400>
 33. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, 2008. *CA: a cancer journal for clinicians* [Internet]. 2008 [cited 2012 Mar 5];58(2):71–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18287387>
 34. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil [Internet]. Rio de Janeiro: 2011. Available from: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>
 35. Pallante P, Visone R, Croce CM, Fusco A. Deregulation of microRNA expression in follicular-cell-derived human thyroid carcinomas. *Endocrine-related cancer* [Internet]. 2010 Mar [cited 2012 Jun 27];17(1):F91–104. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19942715>
 36. Cruz XDL, Lois S. Do protein motifs read the histone code? *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* [Internet]. 2005 Feb [cited 2012 Jun 19];27(2):164–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15666348>
 37. Mellor J. Dynamic nucleosomes and gene transcription. *Trends in genetics : TIG* [Internet]. 2006 Jun [cited 2012 Jul 5];22(6):320–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16631276>
 38. Ahn S-H, Cheung WL, Hsu J-Y, Diaz RL, Smith MM, Allis CD. Sterile 20 kinase phosphorylates histone H2B at serine 10 during hydrogen peroxide-induced apoptosis in *S. cerevisiae*. *Cell* [Internet]. 2005 Jan 14 [cited 2012 Apr 3];120(1):25–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15652479>
 39. Fischle W, Wang Y, Allis CD. Histone and chromatin cross-talk. *Current opinion in cell biology* [Internet]. 2003 Apr [cited 2012 Jul 5];15(2):172–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12648673>
 40. Margueron R, Trojer P, Reinberg D. The key to development: interpreting the histone code? *Current opinion in genetics & development* [Internet]. 2005 Apr [cited 2012 Jul 10];15(2):163–76. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959437X05000237>
 41. Grosschedl R, Giese K, Pagel J. HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends in genetics : TIG* [Internet].
-

-
- 1994 Mar [cited 2012 Apr 22];10(3):94–100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8178371>
42. Reeves R, Nissen MS. The A.T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure. *The Journal of biological chemistry* [Internet]. 1990 May 25 [cited 2012 Jun 19];265(15):8573–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1692833>
43. Thanos D, Maniatis T, Gene I-p. The High Mobility Group Protein HMG I (Y) Is Required for NF-KB-Dependent Virus Induction of the Human IFN-P Gene. 1992;71:777–89.
44. Abdulkadir S a, Krishna S, Thanos D, Maniatis T, Strominger JL, Ono SJ. Functional roles of the transcription factor Oct-2A and the high mobility group protein I/Y in HLA-DRA gene expression. *The Journal of experimental medicine* [Internet]. 1995 Aug 1;182(2):487–500. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2192141&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
45. Berlingieri MT, Manfioletti G, Santoro M, Bandiera A, Visconti R, Giacotti V, et al. Inhibition of HMGI-C Protein Synthesis Suppresses Retrovirally Induced Neoplastic Transformation of Rat Thyroid Cells. 1995;15(3):1545–53.
46. Berlingieri MT, Pierantoni GM, Giacotti V, Santoro M, Fusco A. Thyroid cell transformation requires the expression of the HMGA1 proteins. 2002;
47. Scala S, Portella G, Fedele M, Chiappetta G, Fusco A. Adenovirus-mediated suppression of HMGI (Y) protein synthesis as potential therapy of human malignant neoplasias. 2000;
48. Mansueto G, Forzati F, Ferraro A, Pallante P, Bianco M, Esposito F, et al. Identification of a New Pathway for Tumor Progression: MicroRNA-181b Up-Regulation and CBX7 Down-Regulation by HMGA1 Protein. *Genes & cancer* [Internet]. 2010 Mar [cited 2012 Jun 21];1(3):210–24. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3092193&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
49. Volinia S, Calin GA, Liu C-gong, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet]. 2006 Feb 14 [cited 2012 Jul 5];103(7):2257–61. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1413718&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
50. Pallante P, Terracciano L, Carafa V, Schneider S, Zlobec I, Lugli A, et al. The loss of the CBX7 gene expression represents an adverse prognostic marker for survival of colon carcinoma patients. *European journal of cancer* (Oxford,
-

-
- England : 1990) [Internet]. 2010 Aug [cited 2012 Jun 26];46(12):2304–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2010.05.011>
51. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature reviews. Cancer* [Internet]. 2006 Nov [cited 2012 Jun 21];6(11):857–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17060945>
52. Liu C-G, Calin GA, Meloon B, Gamlie N, Sevignani C, Ferracin M, et al. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet]. 2004 Jun 29;101(26):9740–4. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=470744&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
53. Fedele M, Visone R, De Martino I, Troncone G, Palmieri D, Battista S, et al. HMGA2 induces pituitary tumorigenesis by enhancing E2F1 activity. *Cancer cell* [Internet]. 2006 Jun [cited 2012 Jul 5];9(6):459–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16766265>
54. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)* [Internet]. 2001 Dec [cited 2012 Mar 9];25(4):402–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609>
55. Pierantoni GM, Rinaldo C, Esposito F, Mottolese M, Soddu S, Fusco a. High Mobility Group A1 (HMGA1) proteins interact with p53 and inhibit its apoptotic activity. *Cell death and differentiation* [Internet]. 2006 Sep [cited 2012 Apr 27];13(9):1554–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16341121>
56. Palmieri D, D'Angelo D, Valentino T, De Martino I, Ferraro a, Wierinckx a, et al. Downregulation of HMGA-targeting microRNAs has a critical role in human pituitary tumorigenesis. *Oncogene* [Internet]. 2011 Dec 5 [cited 2012 Jun 14];(November):1–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22139073>
57. Leone V, D'Angelo D, Rubio I, de Freitas PM, Federico A, Colamaio M, et al. MiR-1 is a tumor suppressor in thyroid carcinogenesis targeting CCND2, CXCR4, and SDF-1alpha. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* [Internet]. 2011 Sep [cited 2012 Jun 14];96(9):E1388–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21752897>
58. Jo DH, Kim JH, Park W-Y, Kim K-W, Yu YS, Kim JH. Differential profiles of microRNAs in retinoblastoma cell lines of different proliferation and adherence patterns. *Journal of pediatric hematology/oncology* [Internet]. 2011 Oct [cited 2012 Jul 9];33(7):529–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21941147>
59. Kim K, Lee H-C, Park J-L, Kim M, Kim S-Y, Noh S-M, et al. Epigenetic regulation of microRNA-10b and targeting of oncogenic MAPRE1 in gastric
-

-
- cancer. *Epigenetics* [Internet]. 2011 Jun 1 [cited 2012 Jul 5];6(6):740–51. Available from: <http://www.landesbioscience.com/journals/epigenetics/article/15874/>
60. Hollander MC, Blumenthal GM, Dennis P a. PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models. *Nature reviews. Cancer* [Internet]. 2011 Apr [cited 2012 Mar 19];11(4):289–301. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21430697>
61. Alimonti A, Carracedo A, Clohessy JG, Trotman LC, Nardella C, Egia A, et al. Subtle variations in Pten dose determine cancer susceptibility. *Nature genetics* [Internet]. 2010 May [cited 2012 Jul 5];42(5):454–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3118559&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
62. Berger AH, Knudson AG, Pandolfi PP. A continuum model for tumour suppression. *Nature* [Internet]. 2011 Aug 11 [cited 2012 Mar 20];476(7359):163–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3206311&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
63. Trotman LC, Niki M, Dotan Z a, Koutcher J a, Di Cristofano A, Xiao A, et al. Pten dose dictates cancer progression in the prostate. *PLoS biology* [Internet]. 2003 Dec [cited 2012 May 1];1(3):E59. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=270016&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
64. Tay Y, Kats L, Salmena L, Weiss D, Tan SM, Ala U, et al. Coding-independent regulation of the tumor suppressor PTEN by competing endogenous mRNAs. *Cell* [Internet]. 2011 Oct 14 [cited 2012 Feb 29];147(2):344–57. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3235920&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
65. Fedele M, Fidanza V, Battista S, Pentimalli F, Klein-Szanto AJP, Visone R, et al. Haploinsufficiency of the Hmga1 gene causes cardiac hypertrophy and myelo-lymphoproliferative disorders in mice. *Cancer research* [Internet]. 2006 Mar 1 [cited 2012 Jun 14];66(5):2536–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16510570>
66. Cleyne I, Van de Ven WJM. The HMGA proteins: a myriad of functions (Review). *International journal of oncology* [Internet]. 2008 Feb;32(2):289–305. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18202751>
67. Tessari MA, Gostissa M, Altamura S, Sgarra R, Rustighi A, Salvagno C, et al. Transcriptional Activation of the Cyclin A Gene by the Architectural Transcription Factor HMGA2. 2003;23(24):9104–16.
68. Frasca F, Rustighi A, Malaguarnera R, Altamura S, Vigneri P, Del Sal G, et al. HMGA1 inhibits the function of p53 family members in thyroid cancer cells.
-

-
- Cancer research [Internet]. 2006 Mar 15 [cited 2012 Apr 13];66(6):2980–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16540646>
69. Thuault S, Valcourt U, Petersen M, Manfioletti G, Heldin C-H, Moustakas A. Transforming growth factor-beta employs HMGA2 to elicit epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of cell biology* [Internet]. 2006 Jul 17 [cited 2012 Apr 24];174(2):175–83. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2064178&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
70. Reeves R, Edberg DD, Li Y. Architectural transcription factor HMGI(Y) promotes tumor progression and mesenchymal transition of human epithelial cells. *Molecular and cellular biology* [Internet]. 2001 Jan [cited 2012 Jul 6];21(2):575–94. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=86623&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
71. Li S, Liang Z, Xu L, Zou F. MicroRNA-21: a ubiquitously expressed pro-survival factor in cancer and other diseases. *Molecular and cellular biochemistry* [Internet]. 2012 Jan [cited 2012 Mar 30];360(1-2):147–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21909994>
72. Garofalo M, Quintavalle C, Romano G, Croce CM, Condorelli G. miR221/222 in cancer: their role in tumor progression and response to therapy. *Current molecular medicine* [Internet]. 2012 Jan [cited 2012 Jul 6];12(1):27–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22082479>
73. D'Angelo D, Palmieri D, Mussnich P, Roche M, Wierinckx A, Raverot G, et al. Altered MicroRNA Expression Profile in Human Pituitary GH Adenomas: Down-Regulation of miRNA Targeting HMGA1, HMGA2, and E2F1. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* [Internet]. 2012 May 7 [cited 2012 May 15];97(July):1–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22564666>
-

ANEXOS

ANEXO 1 – CARTA DE APROVAÇÃO DO CEP



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

OF.CEP-609/10

Porto Alegre, 29 de junho de 2010.

Senhora Pesquisadora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 10/05029 intitulado **“Identificação de alvos da HMGA: isolamento e caracterização dos microRNAs regulados pelas proteínas HMGA”**.

Salientamos que seu estudo pode ser iniciado a partir desta data.

Os relatórios parciais e finais deverão ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Rodolfo Herberto Schneider
Coordenador do CEP-PUCRS

Ilma. Sra.
Profa. Denise Cantarelli
Nesta Universidade

Silvane
RECEBIDO EM 7/7/10 - 16:21

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 - 3º andar - CEP: 90610-000
Sala 314 - Fone Fax: (51) 3320-3345
E-mail: cep@pucrs.br
www.pucrs.br/prppq/cep

ANEXO 2 – MATERIAL SUPLEMENTAR

Primers usados para os experimentos de imunoprecipitação da Cromatina

10bprom1 Fw CCTGCCCTTCACCATTAGC
10bprom1 Rv CTCAGCGGCAGAAGAAAAG
10bprom2 Fw TGAGGGCATTGTTCCTTTC
10bprom2 Rv GCGACAATTTGAAGCAATGA
10bprom3 Fw GTTGTTTCGCCTGCTTGGA
10bprom3 Rv GTCCCACCCAGAGTGAGGTA

603 prom1 Fw CACCATGCCAGCTAATTTT
603 prom1 Rv CAGCACTTTGGGAGGCTAAG
603 prom2 Fw GATTTTCAGGCATGAGCCACT
603 prom2 Rv GAAGCACCTTTCCACAGTC
603 prom3 Fw ACGTGCTTGTTGGGAAACTC
603 prom3 Rv GCCTGCATCTTAAGCAAAGG

Primers usados para as análises de qRT-PCR da *CCND1*, *CCND2* e *PTEN*

CCND1 Fw GCACAACGCACTTTCTTTCC
CCND1 Rv TCCAGAAGGACTTCAATCTG

CCND2 Fw CACCGACAACCTGTGAAGC
CCND2 Rv CCACTTCAGCTTACCCAACAC

PTEN Fw GAGGCCCTGGATTTTTATGG
PTEN Rv CGCCTCTGACTGGGAATAGT

Primers usados para as regiões 3'-UTR da *CCND1*, *CCND2* e *PTEN*

3'utr CCND1 Fw AATTTCTAGAGGGGGCGTAGCATCATAGTA
3'utr CCND1 Rv AATTTCTAGAGTGCAACCAGAAATGCACAG

3'utr CCND2 Fw AATTTCTAGACAGCGTTTATGGTGCTTCCT
3'utr CCND2 Rv AATTTCTAGAGAATTCACCACCCATTGTCC

3'utr PTEN Fw AATTTCTAGAAAGAGGGATAAAACAC
3'utr PTEN Rv AATTCTCAGAGCCACTTCAGTTGGTGACAG

ANEXO 3 – ARTIGOS PUBLICADOS

JCEM ONLINE

Hot Topics in Translational Endocrinology—Endocrine Research

MiR-1 Is a Tumor Suppressor in Thyroid Carcinogenesis Targeting CCND2, CXCR4, and SDF-1 α

Vincenza Leone, Daniela D'Angelo, Ileana Rubio, Paula Mussnich de Freitas, Antonella Federico, Marianna Colamaio, Pierlorenzo Pallante, Geraldo Medeiros-Neto, and Alfredo Fusco

Istituto di Endocrinologia ed Oncologia Sperimentale del Consiglio Nazionale delle Ricerche c/o Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare (V.L., D.D., P.M.d.F., A.F., M.C., P.P., A.F.), Facoltà di Medicina e Chirurgia di Napoli, Università degli Studi di Napoli "Federico II," Naples Oncogenomic Center, Centro Ingegneria Genetica and European School of Molecular Medicine (V.L., M.C., A.F.), 80131 Naples, Italy; and Thyroid Unit (I.R., G.M.-N.), Division of Endocrinology, Department of Clinical Medicine, University of São Paulo Medical School, São Paulo, 09972–270 Brazil

Context: Micro-RNA have emerged as an important class of short endogenous RNA that act as posttranscriptional regulators of gene expression and are constantly deregulated in human cancer. MiR-1 has been found down-regulated in lung, colon, and prostate cancer.

Objectives: In this study, we investigated the possible role of miR-1 in thyroid carcinogenesis.

Design: We have analyzed miR-1 expression in a panel of thyroid neoplasias including benign and malignant lesions and searched for miR-1 targets.

Results: Our results show that miR-1 expression is drastically down-regulated in thyroid adenomas and carcinomas in comparison with normal thyroid tissue. Interestingly, miR-1 down-regulation was also found in thyroid hyperproliferative nonneoplastic lesions such as goiters. We identified the *CCND2*, coding for the cyclin D2 (*CCND2*) protein that favors the G1/S transition, *CXCR4*, and *SDF-1 α* genes, coding for the receptor for the stromal cell derived factor-1 (*SDF-1*)/*CXCL12* chemokine and its ligand *SDF-1/CXCL12*, respectively, as miR-1 targets. An inverse correlation was found between miR-1 expression and CXC chemokine receptor 4 (*CXCR4*) and *SDF-1 α* protein levels in papillary and anaplastic thyroid carcinomas. Consistent with a role of the *CCND2* protein in cell proliferation and *CXCR4* and *SDF-1 α* proteins in cell invasion and metastasis, functional studies demonstrate that miR-1 is able to inhibit thyroid carcinoma cell proliferation and migration.

Conclusions: These results indicate the involvement of miR-1 in thyroid cell proliferation and migration, validating a role of miR-1 down-regulation in thyroid carcinogenesis. (*J Clin Endocrinol Metab* 96: E1388–E1398, 2011)

Micro-RNA (miRNA) have emerged as an important class of short endogenous RNA that act as posttranscriptional regulators of gene expression (1). They are small RNA molecules of 19–22 nucleotides in length, which are derived from double-stranded RNA. These tiny fragments of RNA regulate gene expression by hybridizing

to complementary sequences in the 3'-untranslated region (3'-UTR) of target mRNA (2, 3). A majority of identified miRNA are highly evolutionarily conserved among many distantly related species, suggesting that miRNA play a very important role in essential biological processes (4–7). Currently, miRNA have been considered one of the most

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197

Printed in U.S.A.

Copyright © 2011 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/jc.2011-0345 Received February 8, 2011. Accepted June 13, 2011.

First Published Online July 13, 2011

Abbreviations: AKT, Protein kinase B; ATC, anaplastic thyroid cancer; CCND2, cyclin D2; CXCR4, CXC chemokine receptor 4; CREB1, cAMP response element-binding protein 1; EV, empty vector; FA, follicular adenoma; FTC, follicular thyroid carcinoma; IKB, inhibitor of nuclear factor- κ B; MET, hepatocyte growth factor receptor; miRNA, micro-RNA; PTC, papillary thyroid carcinoma; PTU, propylthiouracil; qRT-PCR, quantitative RT-PCR; SDF-1, stromal cell derived factor-1; 3'-UTR, 3'-untranslated region.

important regulatory molecules, which modulate gene expression at posttranscriptional level by targeting mRNA for direct cleavage of mRNA or repression of mRNA translation.

Recently, our group has shown an aberrant miRNA expression profile that clearly differentiates papillary thyroid carcinoma (PTC) from normal thyroid tissues (8, 9). In particular, a significant increase in miR-221, miR-222, and miR-181b was detected in PTC in comparison with normal thyroid tissue. Moreover, we found an aberrant miRNA expression profile that clearly differentiates anaplastic thyroid cancer (ATC) from normal thyroid tissues and from PTC (10).

Previous works have demonstrated that micro-RNA 1 (miR-1) has been found down-regulated in lung (11), liver (12), prostate (13), and rhabdomyosarcoma (14) cancer and that the restoration of miR-1 expression in lung and rhabdomyosarcoma cancer cells reversed their tumorigenic properties, such as growth, replication potential, motility/migration, clonogenic survival, and tumor formation in nude mice. The aim of our work has been to investigate the possible role of miR-1 in thyroid carcinogenesis. Here, we report that miR-1 is drastically reduced in benign and malignant thyroid neoplasias in comparison with normal thyroid.

Materials and Methods

Cell lines and transfections

The human thyroid carcinoma cell lines (TPC-1, FRO, WRO, FB2, and B-CPAP) were grown as previously described (15). Normal and transformed PCC13 cells have been previously described (16–18). For oligonucleotide transfection, cells were transfected with 100 nM pre-miR-1 or scrambled oligonucleotide (Ambion, Austin, TX) using siPORT neoFX Transfection Agent (Ambion) according to the manufacturer's instructions. For the transfection of the miR constructs, cells were transfected with 5 μ g of the miRNA precursor constructs expressing miR-1 or backbone (SBI System Biosciences, Mountain View, CA) and 0.5 μ g of construct expressing G418 resistance gene using Lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. At 24 h after the transfection, the cells were selected with G418 (1 mg/ml) for 3 wk and cultured in a medium containing G418 (500 μ g/ml).

Fresh human thyroid tissue samples

Normal and neoplastic human thyroid tissues were collected at the Service d'Anatomo-Pathologie, Centre Hospitalier Lyon Sud, France. We declare that informed consent for the scientific use of biological material was obtained from patients.

Mice

Thyroid hyperplasia was induced as described in Supplemental Materials and Methods (published on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://jcem.endojournals.org>).

RNA extraction and quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Total RNA was isolated from cells and human tissues with Trizol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Quantitative RT-PCR for mature miRNA was carried out according to the manufacturer's instructions of the miScript System Kits (QIAGEN, Valencia, CA). Reactions contained miScript Primer Sets (QIAGEN) specific for miR-1 and U6 (used to normalize RNA levels). Quantitative RT-PCR analysis for cyclin D2 (CCND2), CXC chemokine receptor 4 (CXCR4), and stromal cell derived factor-1 α (SDF-1 α) were performed as previously described (19). Each reaction was carried out in triplicate. To calculate the relative expression levels, we used the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (20). For primer sequences, see Supplemental Materials and Methods.

Plasmids and constructs

MiRNA precursor constructs expressing miR-1 under the transcriptional control of the CMV promoter or backbone were purchased from SBI System Biosciences (pCDH-CMV-MCS-EF1). The CCND2, SDF-1 α , and CXCR4-3'-UTR regions, including binding sites for miR-1, were amplified by PCR from genomic DNA by using the primers described in Supplemental Materials and Methods. The amplified fragments were cloned into pGL3-control firefly luciferase vector (Promega, Madison, WI) at the XbaI site. Mutation into miR-1 binding sites of the CXCR4-3'-UTR and SDF-1 α -3'-UTR, was introduced by using QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA) following the manufacturer's instructions. All the primers used are described in Supplemental Materials and Methods.

Luciferase target assays

Cells were cotransfected using siPORT with the modified firefly luciferase vector (0.2 μ g) described above, the Renilla luciferase reporter plasmid (pRL-CMV; Promega) (30 ng) and the RNA oligonucleotides (50 nM). Firefly and Renilla luciferase activities were measured 24 h after transfection with the dual-luciferase reporter assay system (Promega). Firefly activity was normalized to Renilla activity as control of transfection efficiency.

Protein extraction, Western blotting, and antibodies

Cells were lysed in lysis buffer containing 1% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), and 150 mM NaCl, supplemented with complete protease inhibitors mixture (Roche Diagnostic, Indianapolis, IN). Total proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Amersham, Piscataway, NJ). Membranes were blocked with 5% nonfat milk and incubated with antibodies described in Supplemental Materials and Methods.

Flow cytometry

Cells were analyzed by flow cytometry after 72 h, as previously described (9).

Growth curve assay

Cells were plated at 1×10^4 cells per well in 24-well plates and counted each 24 h for 96 h.

Colony-forming assay

Cells, plated at a density of 90% in 100-mm dishes, were transfected using Lipofectamine with 5 μ g miR-1 or backbone constructs and supplemented with G418 24 h later. The cells were fixed and stained with crystal violet (0.1% crystal violet in 20% methanol) after 2 wk, and colonies were counted.

Cell migration

Cells (1×10^4) in 200 μ l serum-free DMEM were placed on polycarbonate membrane (8-mm pore) in the upper compartment, whereas 500 μ l DMEM/10% FBS was added to the lower compartment. The plates were incubated at 37 C for 24 h. After incubation, the cells at the upper side of the membrane were mechanically removed and treated as described in Supplemental Materials and Methods.

Cell invasion

It was performed as described for the cell migration assay but using polycarbonate membranes coated with 1.2 mg/ml extracellular matrix (Matrigel; BD Biosciences, San Jose, CA).

Scratch wound healing assay

Cells after confluence were treated with mytomicin C for 3 h. Wounds were generated with a sterile pipette. Cells were rinsed twice with PBS, and fresh culture medium was added. Areas of wounds were marked and photographed at various time points with a phase-contrast microscope.

Soft agar colony assay

Cells were mixed in DMEM 2 \times (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), tryptose phosphate buffer, and 1.25% of Noble Agar (Difco Laboratories Inc., Detroit, MI) and plated in 60-mm dishes on the top of 1% agar base. The colonies were counted after 3 wk.

Results

MiR-1 is down-regulated in benign and malignant thyroid neoplasias

To evaluate the possible role of miR-1 in thyroid cancer, we analyzed the miR-1 expression in a panel of normal thyroid and hyperplastic and neoplastic thyroid tissues including benign and malignant lesions. As shown in Fig. 1A, miR-1 was down-regulated in follicular thyroid carcinoma (FTC), PTC, and ATC in comparison with normal thyroid without any correlation with the degree of the malignant phenotype. The average change between normal thyroid and carcinoma tissues was 5-fold. Moreover, down-regulation of miR-1 level has been also observed in a panel of thyroid carcinoma cell lines (Fig. 1B). Interestingly, miR-1 was down-regulated also in goiters and follicular adenomas (FA) in comparison with normal tissues (Fig. 1C), suggesting miR-1 down-regulation was also associated to thyroid cell proliferation independently from the malignant phenotype. To further confirm this hypothesis, we analyzed miR-1 expression in rat thyroid PCCL3

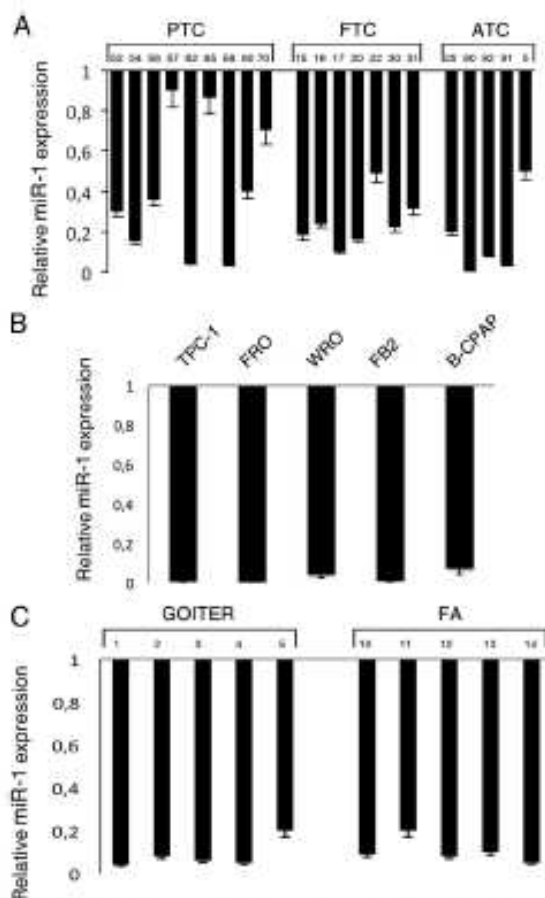


FIG. 1. MiR-1 is down-regulated in goiters and benign and malignant thyroid neoplasias. A, qRT-PCR analysis of miR-1 in a panel of normal and carcinoma thyroid tissues; B, qRT-PCR analysis of miR-1 in human thyroid carcinoma cell lines; C, qRT-PCR analysis of miR-1 in a panel of goiters and adenomas. The relative expression values indicate the relative change in the expression levels between normal thyroid and adenoma or carcinoma samples or carcinoma cell lines (A–C), assuming that the value of normal thyroid tissue is equal to 1. Each bar represents the mean values \pm SE from experiments performed in triplicate.

cells, which means cells growing regularly in culture, in comparison with rat thyroid gland where thyroid cells are essentially in a quiescent phase. As shown in Fig. 2A, miR-1 expression was much lower in PCCL3 with respect to thyroid tissue. Moreover, miR-1 expression was lower in thyroid goiters induced by propylthiouracil (PTU) treatment, which leads to increased TSH serum levels, in comparison with the untreated thyroid glands (Fig. 2B).

MiR-1 targets CCND2

Because miRNA are able to modulate gene expression at the posttranscriptional level by targeting mRNA, studies were undertaken to identify the targets for miR-1, using

bioinformatic tools. Among the predicted targets, we focused on the *CCND2* gene that codes for the CCND2 protein that has a critical role in the cell cycle G1/S transition, thus accounting for a role of miR-1 down-regulation in the increased proliferation of thyroid cells as occurring in goiters and adenomas.

To validate the influence of miR-1 on the *CCND2* target, we transfected the miR-1 oligonucleotide into the TPC-1 and FRO cells, deriving from thyroid papillary and anaplastic carcinoma, respectively, and after 48 h, we searched for changes in *CCND2* protein levels by Western blot analysis. Introduction of miR-1 decreased *CCND2* protein levels (Fig. 2D). Interestingly, a significant decrease in *CCND2* mRNA level was observed in cells transfected with the miR-1 with respect to scrambled oligonucleotide (Fig. 2E). This result indicates that miR-1 affects *CCND2* protein synthesis by facilitating the specific degradation of *CCND2* mRNA. Most miRNA are thought to control gene expression by base pairing with the miRNA-recognizing elements found in their messenger target. To demonstrate that the direct interaction between miR-1 and *CCND2* mRNA was responsible of the *CCND2* protein decreased expression, we inserted the *CCND2*-3'-UTR including the miR-1 seed sites downstream of the luciferase open reading frame. This reporter vector was transfected into FRO cells with the miR-1 or scrambled oligonucleotides. The luciferase activity was markedly diminished after miR-1 transfection, as compared with the scrambled oligonucleotide (Fig. 2F). These results indicate that the miR-1 interferes with *CCND2* translation through direct interaction with its 3'-UTR.

MiR-1 targets CXCR4 and its ligand SDF-1 α

The reduction of miR-1 was observed also in malignant thyroid lesions. Therefore, searching for potential mRNA targets of human miR-1, we focused on *CXCR4* chemokine receptor gene and its ligand *SDF-1*, also called *CXCL12*, respectively. *CXCR4* is one of the most important chemokine receptors for cancer cells and is a seven-transmembrane G protein-coupled receptor (21). It is expressed in a great number of human solid and hematological cancers, including breast, prostate, brain, colon, and lung cancer (22, 23) and has a critical role in the ability of neoplastic cells to metastasize (24–27). Even though the down-regulation of *SDF-1* has been reported in thyroid adenomas (28), overexpression of *CXCR4* and *SDF-1 α* has been frequently described in human thyroid cancer (29, 30).

One site that matches the miR-1 seed sequence was predicted in both 3'-UTR sequences of these genes (Fig. 3A and F). Western blot analysis in the FRO cell line shows that *CXCR4* and *SDF-1 α* protein levels are lower in the miR-1-transfected cells than in cells transfected with a

scrambled oligonucleotide (Fig. 3, B and G). Interestingly, a significant decrease in *CXCR4* mRNA level was observed in the cells transfected with the miR-1 with respect to the scrambled oligonucleotide (Fig. 3C), whereas *SDF-1 α* mRNA expression levels are unchanged (Fig. 3H), indicating that miR-1 affects *CXCR4* protein synthesis by facilitating the specific degradation of *CXCR4* mRNA. We also show that miR-1 transfection down-regulates the luciferase activity of a reporter construct carrying the 3'-UTR-*CXCR4* or 3'-UTR-*SDF-1 α* sequence (Fig. 3, D and I), and the mutation in the putative 3'-UTR site inhibits the sensitivity of the reporter constructs to miR-1. These results have been confirmed using also the TPC-1 cells (Fig. 3B) that express *CXCR4* but not *SDF-1 α* . However, the *SDF-1/CXCR4* pathway is still active in TPC-1 cells because the serum contains the *SDF-1 α* factor. It has been previously reported that stimulation of *CXCR4* induces the activation of several kinase cascades mainly through the activation of the $\beta\gamma$ -subunit of the Gi protein (31, 32). Therefore, we analyzed the phosphorylation status of two downstream effectors, ERK1/2 and protein kinase B (AKT), and the protein levels of an inhibitor of nuclear factor- κ B (IKB) that is degraded by the ubiquitin system after phosphorylation by IKB kinase activated by stimulation of the *CXCR4/SDF-1 α* pathway, in FRO transfected with the miR-1 with respect to the scrambled oligonucleotide. As shown in Fig. 3E, total AKT and ERK protein level does not change after restoration of miR-1 expression, but their phosphorylation, evaluated using antibodies able to recognize the specific phosphorylated forms of AKT and ERK, is lower in FRO-miR-1 cells in comparison with FRO-empty vector (EV) (Fig. 3E). Conversely, IKB protein was, as expected, more abundant in FRO-miR-1 cells (Fig. 3E).

MiR-1 regulates CXCR4 and SDF-1 α protein *in vitro* and *in vivo*

Previous studies have consistently shown an increased *CXCR4* and its ligand *SDF-1 α* expression in human PTC and ATC (18, 30, 33, 34). Therefore, the results presented here indicating *CXCR4* and *SDF-1 α* as targets of miR-1 would lead to the hypothesis that the decreased miR-1 expression might, at least partially, account for the *CXCR4* and *SDF-1 α* increased levels in PTC and ATC. To verify this hypothesis, we have analyzed the *CXCR4* and *SDF-1 α* proteins and the miR-1 levels in a set of PTC and ATC. As shown in Fig. 4A, increased *CXCR4* and *SDF-1 α* protein levels were observed in FA, PTC, FTC, and ATC analyzed showing a decreased miR-1 expression (Fig. 4, A and B), in comparison with the normal thyroid tissue. An inverse correlation between *CXCR4/SDF-1 α* expression was also found in human thyroid carcinoma cell lines and

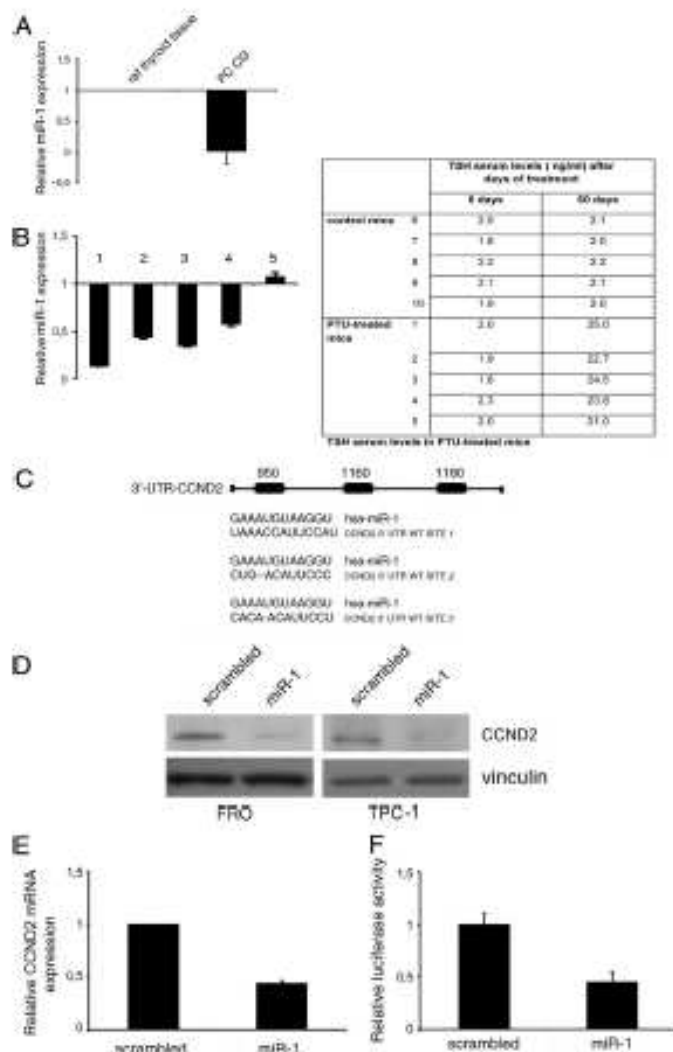


FIG. 2. CCND2 is a target of miR-1. **A**, qRT-PCR analysis of miR-1 in rat thyroid tissue and PCC13 cells. The relative expression values indicate the relative change in the expression levels between PCC13 cells and rat thyroid tissue, assuming that the value of rat thyroid tissue is equal to 1. Each bar represents the mean values \pm SE from experiments performed in triplicate. **B**, *left panel*, qRT-PCR analysis of miR-1 in a panel of thyroids derived from untreated and PTU-treated mice. The numbers 1, 2, 3, 4, and 5 refer to each different mouse treated with PTU. The relative expression values indicate the relative change in the expression levels between murine goiters and untreated thyroids (five), assuming that the value of untreated thyroids is equal to 1. Each bar represents the mean values \pm SE from experiments performed in triplicate. *right panel*, TSH serum levels in control and PTU-treated mice. TSH levels were expressed as nanograms per milliliter. **C**, Schematic representation of the wild-type and mutated 3'-UTR sites of the CCND2 gene targeted by miR-1. **D**, Western blots of the CCND2 and vinculin proteins, used as loading control. Proteins were extracted from FRO and TPC-1 cells transfected with scrambled or miR-1 oligonucleotide and collected after 48 h. **E**, qRT-PCR analysis of CCND2 mRNA in FRO cells shown in **D**. Relative expression values indicate the relative change in mRNA expression levels between miR-treated and scrambled oligonucleotide-treated cells, normalized with GAPDH. The error bars represent the mean values \pm SE ($n = 3$). **F**, Relative luciferase activity in FRO cells transiently transfected for 24 h with wild-type constructs for miR-1 seed sequence and with miR-1 oligonucleotide and a control no-targeting scrambled oligonucleotide. The relative activity of firefly luciferase expression was standardized to a transfection control, using Renilla luciferase. The bars represent the mean values \pm SE ($n = 3$). $P < 0.05$ vs. the scrambled oligonucleotide.

in rat thyroid cells after transformation with different oncogenes (v-ras-Ha, v-ras-Ki, v-raf, middle T-Py, RET/PTC-1, and BRAF) (Supplemental Fig. 1, A and B, respectively). In goiters, we found an inverse correlation between miR-1 and CCND2 protein (Supplemental Fig. 1C), whereas we did not observe any increase in CXCR4 and SDF-1 expression with respect to the normal thyroid tissue (Fig. 4A).

Restoration of miR-1 expression reduces the cell growth rate, motility, and migration of thyroid carcinoma cell lines

To determine whether the reduced miR-1 expression affects thyroid carcinogenesis, we evaluated the growth rate of two thyroid carcinoma cell lines transfected with a miR-1 expression vector. To this aim, we carried out a colony-forming assay on FRO and TPC-1 cells, transfecting them with the miR-1 gene or the backbone vectors. As shown in Fig. 5A, FRO and TPC-1 cells transfected with miR-1 generated a lower number of colonies than control transfected cells. Next, to examine the antitumorigenic function of miR-1 in thyroid cancer cells, we generated FRO and TPC-1 stable cells expressing miR-1 (FRO-miR-1 and TPC1-miR-1, respectively). Quantitative RT-PCR demonstrated a higher than 10-fold increase of miR-1 in the FRO-miR-1 and TPC-1-miR-1 cells with respect to the cells transfected with the backbone vector (FRO-EV and TPC-1-EV, respectively) (Fig. 5B). As shown in Fig. 5C, FRO-miR-1 and TPC-1-miR-1 cells grow at a significantly lower rate in comparison with the untransfected and control vector-transfected cells.

Then, we investigated the cell cycle phase distribution of miR-1 stably transfected FRO or TPC-1 cells through flow cytometric analysis. As shown in Fig. 5D, FRO-miR-1 and TPC-1-miR-1 showed a significant decrease in the transition from the G1 to the S phase compared with the FRO-EV and TPC-

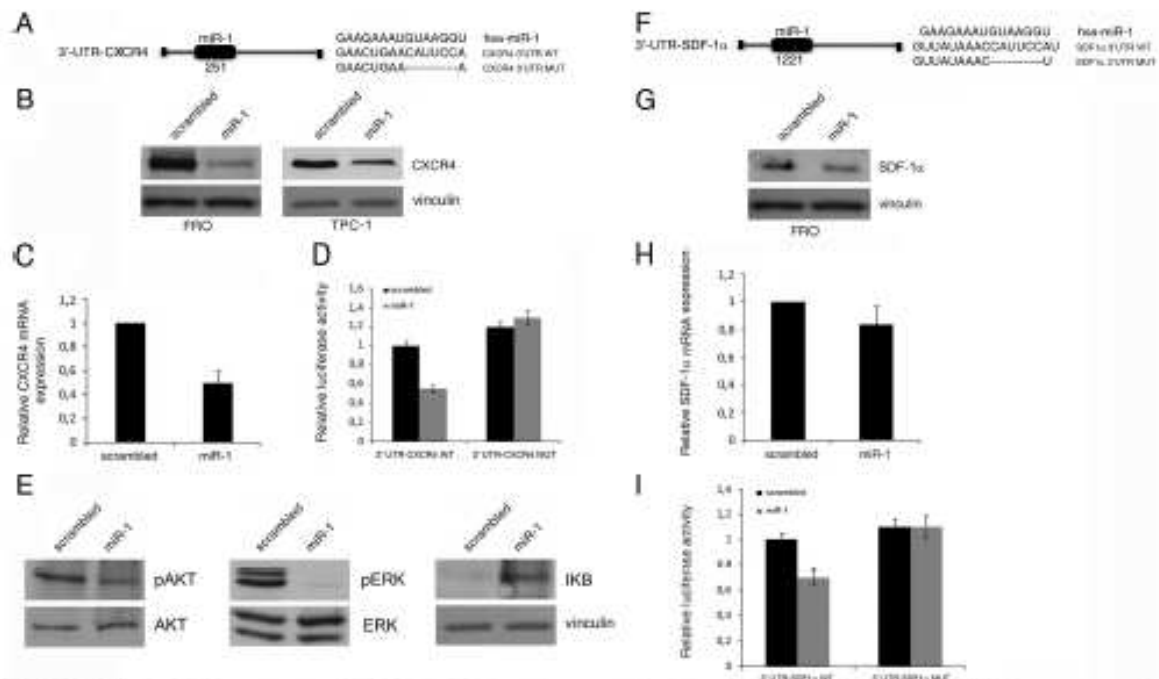


FIG. 3. CXCR4 and SDF-1 α are targets of miR-1. A and F, Schematic representation of the 3'-UTR sites of the CXCR4 and SDF-1 α genes targeted by miR-1. B and G, Western blot analysis of CXCR4 and SDF-1 α protein expression. Vinculin protein has been used as loading control. Proteins were extracted from the indicated cells transfected with scrambled or miR-1 oligonucleotides and collected after 48 h. C and H, qRT-PCR analysis of CXCR4 and SDF-1 α mRNA in FRO cells shown in B and G. Relative expression values indicate the relative change in CXCR4 or SDF-1 α mRNA expression levels between miR-treated and scrambled oligonucleotide-treated cells, normalized with GAPDH. The error bars represent the mean values \pm SE (n = 3). P < 0.05 vs. scrambled control. D and I, Relative luciferase activity in FRO cells transiently transfected for 24 h with wild-type or mutant constructs for miR-1 seed sequence and with miR-1 oligonucleotide and a control no-targeting scrambled oligonucleotide. The relative activity of firefly luciferase expression was standardized to a transfection control, using Renilla luciferase. The bars represent the mean values \pm SE (n = 3). P < 0.05 vs. the scrambled oligonucleotide. E, Western blot analysis of downstream targets of the SDF1/CXCR4 axis.

1-EV cells. In fact, as far as the FRO-miR-1 and TPC-1-miR-1 cells are concerned, 12 and 8% were counted in the S phase, respectively, whereas 20 and 15% of the FRO-EV and TPC-1-EV cells were in S phase (Fig. 5D).

Moreover, the cell population in the sub-G1 phase of the cell cycle, which corresponds to apoptotic cells, was much higher in FRO-miR-1 and TPC-1-miR-1 cells (15 and 10%, respectively) than in the FRO-EV and TPC-1-EV cells

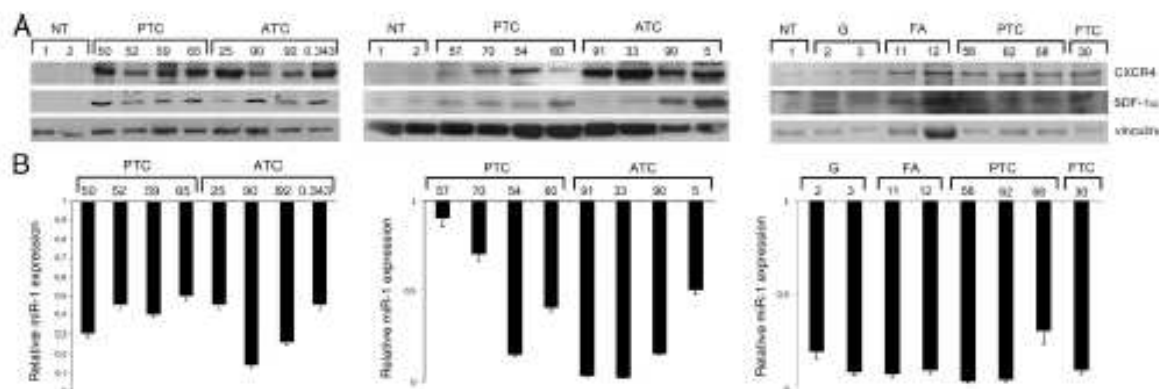


FIG. 4. CXCR4 and SDF-1 α protein expression is inversely correlated with miR-1 expression in goiter (G), FA, FTC, PTC, and ATC tissues. A, Western blot analysis of CXCR4 and SDF-1 α protein expression. The level of vinculin has been used as loading control; B, miR-1 qRT-PCR analysis. The relative expression values indicate the relative change in the expression levels between normal and adenoma or carcinoma thyroid tissues, assuming that the value of normal thyroid (NT) tissue is equal to 1.

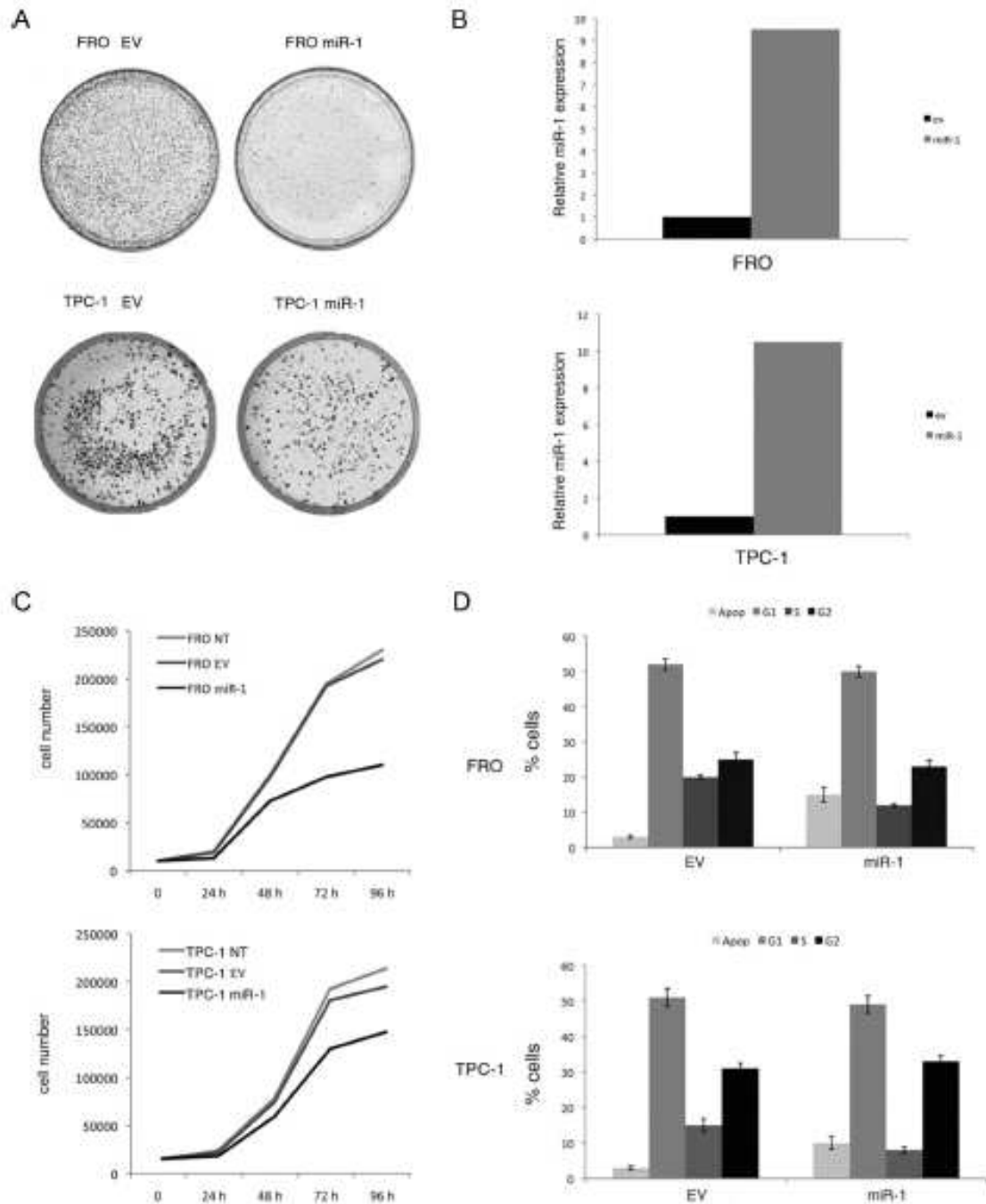


FIG. 5. Overexpression of miR-1 inhibits thyroid cell proliferation. **A**, Colony-forming assay of FRO and TPC-1 cells transfected with a vector expressing miR-1 (SBI's miRNA precursor constructs) under the transcriptional control of the CMV promoter. The EV served as a control. **B**, miR-1 qRT-PCR analysis of FRO-miR-1, TPC-miR-1, FRO-EV, and TPC-1-EV cells. The relative expression values indicate the relative change in the expression levels between miR-1 and EV samples, assuming that the value of EV samples is equal to 1. **C**, Cell proliferation assay of FRO-miR-1, TPC-1-miR-1, FRO-EV, and TPC-1-EV cells. Cells were seeded in 24-well plates at 1×10^4 cells per well. The cells were counted each 24 h for 96 h after plating. The y-axis represents absolute viable cell count. Each bar represents the mean values \pm SE from three independent experiments performed in triplicate. **D**, Flow cytometric analysis of FRO-miR-1, TPC-1-miR-1, FRO-EV, and TPC-1-EV cells. The cells were seeded in six-well plates (2.5×10^5 cells per well). The DNA of the transfected cells was analyzed 72 h later with plating by flow cytometry after propidium iodide staining. Each bar represents the mean values \pm SE from three independent experiments performed in triplicate.

(3 and 4%, respectively). Therefore, these results clearly indicate the ability of miR-1 to exert an apoptotic effect, probably consequent to the induced inability to overcome the G1 phase.

It is well known that the activation of the SDF-1 α /CXCR4 pathway plays an important role in cell invasion and migration and, thereby, in the cells ability to metastasize. Therefore, we evaluated the effect of miR-1 overexpression on the ability of FRO and TPC-1 cells to migrate. For this purpose, two different methods have been approached. First, we performed a scratch wound healing assay. Motility of FRO-miR-1 and FRO-EV cells at confluence, incubated for 3 h with mitomycin C to inhibit the proliferation, was monitored under a microscope at different time points after generation of the wound. Closure of the wound was completed within 24 h in control FRO-EV cells (Fig. 6A), whereas it occurs only after 24 h in the FRO-miR-1 cells.

Then, we performed a migration assay. The cells were seeded in serum-free medium on the top chamber of a two-chamber trans-well cell culture plate. Colorimetric estimation of the cells migrated to the lower chamber revealed a lower number of FRO-miR-1 cells compared with that of the FRO-EV cells (Fig. 6B). Similar results have been obtained with TPC-1-miR-1 and TPC-1-EV cells (Fig. 6B).

Furthermore, to investigate the role of miR-1 in invasivity and, then, in the progression of thyroid carcinogenesis, we evaluated the effect of miR-1 restoration on the malignant phenotype by performing an invasion and a soft agar assays. As shown in Fig. 6C, the restoration of miR-1 expression levels in the FRO cells inhibited their ability to invade the Matrigel matrix. Moreover, the FRO-miR-1 cells lose the ability to grow in an anchorage-independent manner (Fig. 6D).

Therefore, these results clearly demonstrate that miR-1 expression markedly reduces the migration/motility and invasivity of thyroid cancer cells.

Discussion

Here, we report that miR-1 is drastically down-regulated in human thyroid goiters and neoplasias, suggesting a correlation between miR-1 down-regulation and thyroid cell growth. Therefore, these data would clearly support a tumor suppressor role of miR-1. Indeed, overexpression of miR-1 in a couple of human thyroid carcinoma cell lines causes a drastic reduction of proliferation rate with an increased number of the cell population in sub-G1 phase of the cell cycle. This is consistent with previous data showing the miR-1 ability to reverse the tumorigenic prop-

erties of lung cancer cells (11). Consistent with a role of the miR-1 down-regulation in thyroid cell proliferation, we have identified as a target of miR-1 the *CCND2* gene that codes for the CCND2 protein that has a critical role in cell proliferation. We also report the identification of the *CXCR4* and *SDF-1 α* genes as targets of miR-1. In fact, we show that the enforced expression of the miR-1 significantly decreases the CXCR4 and SDF-1 α protein levels. This effect on the SDF-1 α expression seems due to an inhibition of the *SDF-1 α* mRNA translation process because no significant changes were observed in the mRNA levels after miR-1 treatments. Conversely, miR-1 is able to down-regulate CXCR4 protein levels by acting on the specific *CXCR4* mRNA degradation. However, in both cases, miR-1 directly regulates the expression of these two proteins because we show that miR-1 is able to negatively regulate the expression of the *CXCR4* gene and *SDF-1 α* 3'-UTR-based reporter constructs and this regulation is dependent on the target sites located in the *CXCR4* and *SDF-1 α* -3'-UTR sequences. The identification of these targets may account for one of the mechanisms by which miR-1 is involved in thyroid carcinogenesis. Indeed, the *CXCR4* gene codes for a protein also called fusin, which is an α -chemokine receptor specific for SDF-1/CXCL12, a molecule endowed with potent chemotactic activity for lymphocytes (35). Both proteins are frequently overexpressed in PTC and play a major role in the mechanism of lymph node metastasis from primary tumor (30, 36).

The regulation of CXCR4 and its ligand by miR-1 can, at least partially, account for their increased expression in thyroid neoplasias. Indeed, we show a significant inverse correlation between CXCR4 and SDF-1 α protein levels and miR-1 expression in FA, PTC, and ATC. Of course, our results do not exclude that other mechanisms, acting at a transcriptional level, may account for the increased CXCR4 and SDF-1 α expression in PTC. In fact, miR-1 down-regulation would likely synergize with these mechanisms.

Recent results have also reported that miR-1 is able to target the tyrosine kinase receptor for hepatocyte growth factor, encoded by the hepatocyte growth factor receptor (*MET*) oncogene (12). The *MET* receptor promotes a complex biological program named invasive growth that results from stimulation of cell motility, invasion, and protection from apoptosis. This oncogene is overexpressed in many human malignant neoplasias (37). Here, we show that miR-1 down-regulates the *MET* gene also in thyroid cells (Supplemental Fig. 2), confirming a role of miR-1 in cell migration. Moreover, we have recently shown that cAMP response element-binding protein 1 (*CREB1*) is a direct target of miR-1 (Leone, V., D. D'Angelo, A. Ferraro, P. L. Pallante, I. Rubio, M. Santoro, C. M. Croce, and A.

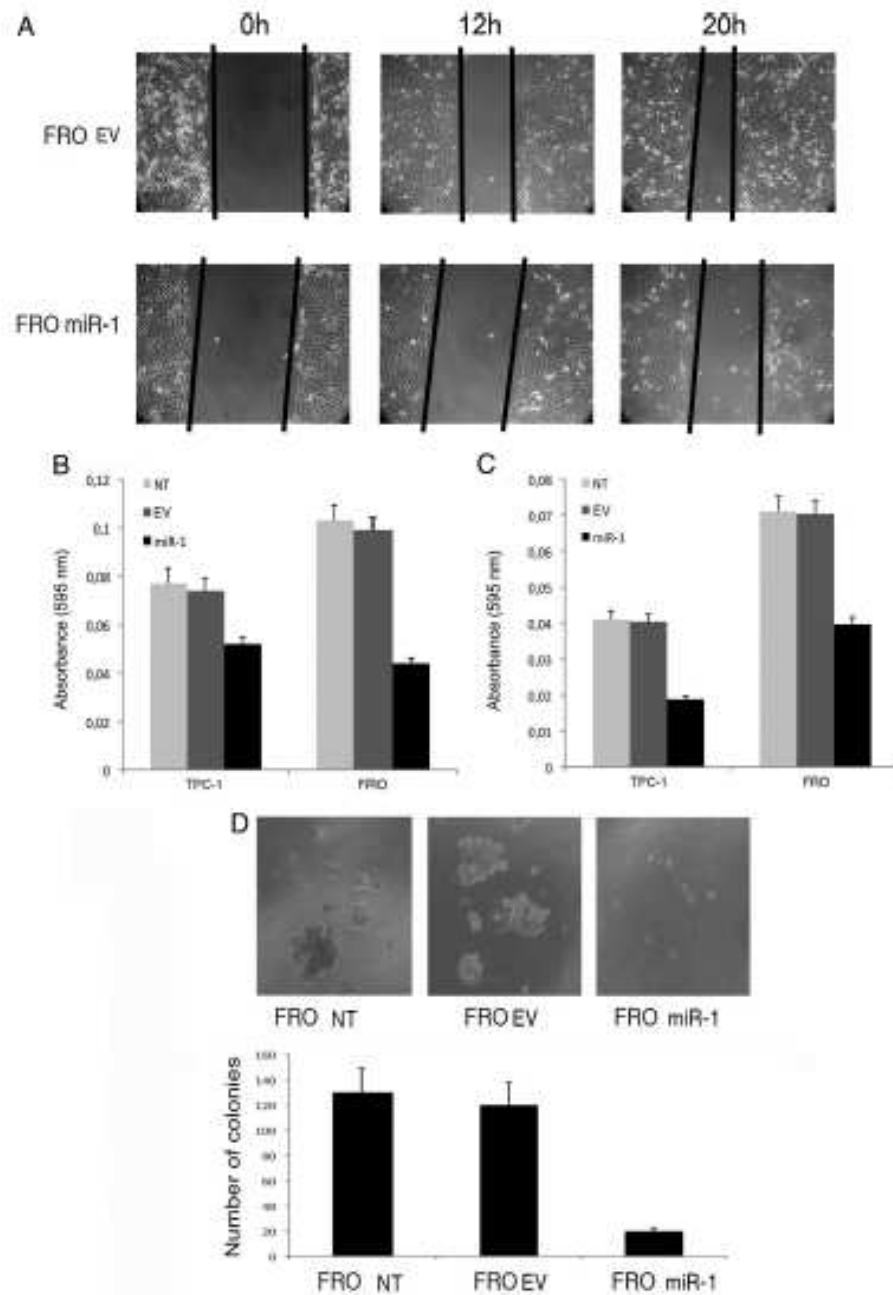


FIG. 6. Overexpression of miR-1 inhibits thyroid cell migration. **A**, FRO-miR-1 and FRO-EV cells were plated at equal density in six-well plates and grown to confluence and incubated for 3 h with mitomycin C to inhibit the proliferation. Uniform scratch was made in each confluent layer culture, the extent of wound closure was monitored under a phase-contrast microscope, and photographs were taken at 0, 12, and 20 h. **B**, Migration assay. Colorimetric evaluation of the cells migrated from the upper to the lower chamber. The cells were stained with crystal violet, solubilized in acetic acid and methanol (1:1), and absorbance was measured at 595 nm. The results are the means of three independent experiments \pm SE. **C**, Invasion assay by colonimetric evaluation of the cells that invaded the Matrigel matrix. The cells were stained with crystal violet and solubilized in acetic acid and methanol (1:1), and absorbance was measured at 595 nm. The results are means of three independent experiments \pm SE. **D**, Analysis of anchorage-independent growth of FRO-miR-1 and FRO-EV cells. A total of 5×10^4 cells per 60-mm dish were used for this assay. A representative section of colonies formed after 4 wk is shown. The FRO-miR-1 showed a drastic reduction in the number of colonies in comparison with the untransfected and EV-transfected FRO cells.

Fusco, manuscript in preparation). These results would account for a key role of miR-1 down-regulation in the growth of normal thyroid cells where CREB1 has a relevant role in thyroid cell proliferation. Indeed, TSH, through activation of its receptor, stimulates the cAMP pathway eventually leading to CREB1 phosphorylation and transcriptional activation. Consistent with this finding, we have demonstrated that TSH stimulation induces a drastic miR-1 down-regulation in rat thyroid cells (Leone, V., *et al.*, manuscript in preparation). In conclusion, our data indicate a role of miR-1 down-regulation in thyroid cell growth and transformation.

Acknowledgments

We are grateful to Mario Berardone for artwork and Andrea Affuso for mice treatment.

Address all correspondence and requests for reprints to: Alfredo Fusco, Istituto di Endocrinologia ed Oncologia Sperimentale del CNR, via Pansini 5, 80131 Napoli, Italy. E-mail: alfosco@unina.it.

This work was supported by grants from the Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro.

Disclosure Summary: The authors declare no conflict of interest.

References

- Bartel DP 2004 MicroRNA: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281–297
- Ambros V 2004 The functions of animal microRNA. *Nature* 431:350–355
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP 2005 Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120:15–20
- Kim VN 2005 MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:376–385
- Taganov KD, Boldin MP, Baltimore D 2007 MicroRNA and immunity: tiny players in a big field. *Immunity* 26:133–137
- Stefani G, Slack FJ 2008 Small non-coding RNA in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:219–230
- Hwang HW, Mendell JT 2007 MicroRNA in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br J Cancer* 96(Suppl):R40–R44
- Pallante P, Visone R, Ferracin M, Ferraro A, Berlingieri MT, Troncone G, Chiappetta G, Liu CG, Santoro M, Negrini M, Croce CM, Fusco A 2006 MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. *Endocr Relat Cancer* 13:497–508
- Visone R, Russo L, Pallante P, De Martino I, Ferraro A, Leone V, Borbone E, Petrocca F, Alder H, Croce CM, Fusco A 2007 MicroRNA (miR)-221 and miR-222, both overexpressed in human thyroid papillary carcinomas, regulate p27Kip1 protein levels and cell cycle. *Endocr Relat Cancer* 14:791–798
- Visone R, Pallante P, Vecchione A, Cirombella R, Ferracin M, Ferraro A, Volinia S, Coluzzi S, Leone V, Borbone E, Liu CG, Petrocca F, Troncone G, Calin GA, Scarpa A, Colato C, Tallini G, Santoro M, Croce CM, Fusco A 2007 Specific microRNA are downregulated in human thyroid anaplastic carcinomas. *Oncogene* 26:7590–7595
- Nasser MW, Datta J, Nuovo G, Kutay H, Motiwala T, Majumder S, Wang B, Suster S, Jacob ST, Ghoshal K 2008 Down-regulation of micro-RNA-1 (miR-1) in lung cancer. Suppression of tumorigenic property of lung cancer cells and their sensitization to doxorubicin-induced apoptosis by miR-1. *J Biol Chem* 283:33394–33405
- Datta J, Kutay H, Nasser MW, Nuovo GJ, Wang B, Majumder S, Liu CG, Volinia S, Croce CM, Schmittgen TD, Ghoshal K, Jacob ST 2008 Methylation mediated silencing of MicroRNA-1 gene and its role in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res* 68:5049–5058
- Amb S, Prueitt RL, Yi M, Hudson RS, Howe TM, Petrocca F, Wallace TA, Liu CG, Volinia S, Calin GA, Yfantis HG, Stephens RM, Croce CM 2008 Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. *Cancer Res* 68:6162–6170
- Yan D, Dong Xda E, Chen X, Wang L, Lu C, Wang J, Qu J, Tu L 2009 MicroRNA-1/206 targets c-Met and inhibits rhabdomyosarcoma development. *J Biol Chem* 284:29596–29604
- Pallante P, Berlingieri MT, Troncone G, Krauhoffer M, Orntoft TF, Viglietto G, Calo A, Migliaccio I, Decussini-Petrucci M, Santoro M, Palombini L, Fusco A 2005 UbcH10 overexpression may represent a marker of anaplastic thyroid carcinomas. *Br J Cancer* 93:464–471
- Fusco A, Berlingieri MT, Di Fiore PP, Portella G, Grieco M, Vecchio G 1987 One- and two-step transformations of rat thyroid epithelial cells by retroviral oncogenes. *Mol Cell Biol* 7:3365–3370
- Berlingieri MT, Portella G, Grieco M, Santoro M, Fusco A 1988 Cooperation between the polyomavirus middle-T antigen gene and the human c-myc oncogene in a rat thyroid epithelial differentiated cell line: model of in vitro progression. *Mol Cell Biol* 8:2261–2266
- De Falco V, Guarino V, Avilla E, Castellone MD, Salerno P, Salvatore G, Faviana P, Basolo F, Santoro M, Melillo RM 2007 Biological role and potential therapeutic targeting of the chemokine receptor CXCR4 in undifferentiated thyroid cancer. *Cancer Res* 67:11821–11829
- De Martino I, Visone R, Wierinckx A, Palmieri D, Ferraro A, Capabianca P, Chiappetta G, Forzati F, Lombardi G, Colao A, Trouillas J, Fedele M, Fusco A 2009 HMGA proteins up-regulate CCNB2 gene in mouse and human pituitary adenomas. *Cancer Res* 69:1844–1850
- Livak KJ, Schmittgen TD 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCt}. *Methods* 25:402–408
- Teicher BA, Fricker SP 2010 CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 16:2927–2931
- Burger JA, Kipps TJ 2006 CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 107:1761–1767
- Balkwill F 2004 The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin Cancer Biol* 14:171–179
- Zushi Y, Noguchi K, Hashitani S, Sakurai K, Segawa E, Takaoka K, Toyohara Y, Tanaka N, Kishimoto H, Urade M 2008 Relations among expression of CXCR4, histological patterns, and metastatic potential in adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Int J Oncol* 33:1133–1139
- Chaudary N, Hill RP 2009 Increased expression of metastasis-related genes in hypoxic cells sorted from cervical and lymph nodal xenograft tumors. *Lab Invest* 89:587–596
- Cronin PA, Wang JH, Redmond HP 2010 Hypoxia increases the metastatic ability of breast cancer cells via upregulation of CXCR4. *BMC Cancer* 10:225
- Guo Z, Cai S, Fang R, Chen H, Du J, Tan Y, Ma W, Hu H, Cai S, Liu Y 2007 The synergistic effects of CXCR4 and EGFR on promoting EGF-mediated metastasis in ovarian cancer cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* 60:1–6
- Aust G, Steinert M, Kiessling S, Kamprad M, Simchen C 2001 Reduced expression of stromal-derived factor 1 in autonomous thyroid adenomas and its regulation in thyroid-derived cells. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3368–3376
- Hwang JH, Hwang JH, Chung HK, Kim DW, Hwang ES, Suh JM,

- Kim H, You KH, Kwon OY, Ro HK, Jo DY, Shong M 2003 CXCR4 chemokine receptor 4 expression and function in human anaplastic thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 88:408–416
30. Castellone MD, Guarino V, De Falco V, Carlomagno F, Basolo F, Faviana P, Kruboffer M, Orntoft T, Russell JP, Rothstein JL, Fusco A, Santoro M, Melillo RM 2004 Functional expression of the CXCR4 chemokine receptor is induced by RET/PTC oncogenes and is a common event in human papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* 23:5958–5967
31. Melillo RM, Castellone MD, Guarino V, De Falco V, Cirafici AM, Salvatore G, Caiazzo F, Basolo F, Giannini R, Kruboffer M, Orntoft T, Fusco A, Santoro M 2005 The RET/PTC-RAS-BRAF linear signaling cascade mediates the motile and mitogenic phenotype of thyroid cancer cells. *J Clin Invest* 115:1068–1081
32. Ganju RK, Brubaker SA, Meyer J, Dutt P, Yang Y, Qin S, Newman W, Groupman JE 1998 The α -chemokine, stromal cell-derived factor-1 α , binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. *J Biol Chem* 273:23169–23175
33. Peng SB, Peek V, Zhai Y, Paul DC, Lou Q, Xia X, Fessalu T, Kohn W, Tang S 2005 Akt activation, but not extracellular signal-regulated kinase activation, is required for SDF-1 α /CXCR4-mediated migration of epitheloid carcinoma cells. *Mol Cancer Res* 3:227–236
34. González HE, Leiva A, Tobar H, Böhmwald K, Tapia G, Torres J, Mosso LM, Bueno SM, Gonzalez P, Kalergis AM, Riedel CA 2009 Altered chemokine receptor expression in papillary thyroid cancer. *Thyroid* 19:957–965
35. Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA 1996 A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* 184:1101–1109
36. Yasuoka H, Kodama R, Hirokawa M, Takamura Y, Miyauchi A, Sanke T, Nakamura Y 2008 CXCR4 expression in papillary thyroid carcinoma: induction by nitric oxide and correlation with lymph node metastasis. *BMC Cancer* 8:274
37. Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM 2010 MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:834–848



Submit your manuscript to
The Endocrine Society journals for fast turnaround,
rapid publication, and deposits to PubMed.

www.endo-society.org

Altered MicroRNA Expression Profile in Human Pituitary GH Adenomas: Down-Regulation of miRNA Targeting HMGA1, HMGA2, and E2F1

Daniela D'Angelo, Dario Palmieri, Paula Mussnich, Magali Roche, Anne Wierinckx, Gerald Raverot, Monica Fedele, Carlo Maria Croce, Jacqueline Trouillas, and Alfredo Fusco

Istituto di Endocrinologia ed Oncologia Sperimentale del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) c/o Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare (D.D., D.P., P.M., M.F., A.F.), Facoltà di Medicina e Chirurgia di Napoli, Università degli Studi di Napoli "Federico II," 80131 Naples, Italy; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unité (U)1052 (M.R., A.W.), Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, and University Lyon, F-69000 Lyon, France; INSERM U102B (G.R., J.T.), Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 5292, Lyon Neuroscience Research Center, Neurooncology and Neuroinflammation Team, F-69372 Lyon, and University Lyon1, Lyon, F-69000, France; Department of Molecular Virology, Immunology, and Medical Genetics (C.M.C.), Comprehensive Cancer Center, Ohio State University, Columbus, Ohio 43210; and Naples Oncogenomic Center-CEINGE (Centro di Ingegneria Genetica), Biotecnologie Avanzate-Napoli, and European School of Molecular Medicine (A.F.), Naples Site, 80145 Naples, Italy

Context: MicroRNA (miRNA) are an important class of regulators of gene expression. Altered miRNA expression has been constantly found in human neoplasias and plays an important role in the process of carcinogenesis.

Objective: The aim of this study was to identify specific miRNA whose expression is altered in GH-secreting pituitary adenomas.

Design: Using a miRNACHIP microarray, we have analyzed the miRNA expression profile of human GH adenomas vs. normal pituitary gland.

Results: We report the identification of a set of miRNA, including miR-34b, miR-326, miR-432, miR-548c-3p, miR-570, and miR-603, drastically and constantly down-regulated in GH adenomas. We demonstrate that these miRNA target genes such as high-mobility group A1 (*HMGA1*), *HMGA2*, and *E2F1*, whose overexpression and/or activation plays a critical role in pituitary tumorigenesis. We also show that the enforced expression of the down-regulated miRNA has a negative role on the growth regulation of pituitary adenoma cells. Finally, an inverse correlation is found between the expression of these miRNA and *HMGA1* and *HMGA2* protein levels in GH adenomas.

Conclusion: Our study identifies a specific subset of miRNA, whose down-regulation might contribute to pituitary tumorigenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 97: 0000–0000, 2012

Pituitary tumors are in most cases monoclonal adenomas arising from adenohypophyseal cells and represent about 15% of intracranial tumors (1, 2). GH adenomas (somatotrophic adenomas) correspond to about 20% of all pituitary adenomas. In 30–50% of the GH adenomas, they are

histologically mixed GH/prolactin (PRL) cell adenomas co-secreting PRL and GH (3). Pituitary adenomas appear to result from a multistep and multicausal process in which hereditary genetic predisposition, endocrine factors, and specific somatic mutations may serve as contributing factors.

ISSN Print 0021-072X; ISSN Online 1945-7197
Printed in U.S.A.

Copyright © 2012 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/jc.2011-3482 Received December 28, 2011; Accepted April 13, 2012.

Abbreviations: E2F1, E2 transcription factor 1; HMGA, high-mobility group A; miRNA, microRNA; PRL, prolactin; qRT, quantitative real-time; UTR, untranslated region.

The high-mobility group A (HMGA) protein family consists of four members, HMGA1a, HMGA1b, and HMGA1c (encoded through alternative splicing by the *HMGA1* gene) and HMGA2 (encoded by the *HMGA2* gene) (4, 5). The HMGA proteins interacting with the transcriptional machinery can regulate, positively or negatively, the expression of several genes (6–8). HMGA protein expression is abundant during embryogenesis, whereas it is absent or detected at very low levels in normal adult tissue. Conversely, HMGA overexpression is a constant feature of human malignant neoplasms (9).

We have previously shown that transgenic mice overexpressing *Hmga1* or *Hmga2* genes develop mixed GH/PRL-secreting pituitary adenomas (10, 11) and that the *HMGA2* gene is amplified and overexpressed in several pituitary adenomas (8, 12). The overexpression of the *HMGA* genes would induce pituitary adenomas by enhancing the activity of the E2 transcription factor 1, E2F1, by up-regulating the expression of cyclin B2 and, likely, other genes mainly involved in the regulation of the cell cycle (8, 13).

MicroRNA (miRNA) are a class of small noncoding RNA that regulate gene expression at the posttranscriptional level. They bind to 3'-untranslated regions (3'-UTR) of target mRNA, causing block of translation or mRNA degradation (14). They play important roles in essential processes such as differentiation, cell growth, and cell death (15, 16). Several studies have demonstrated altered expression of specific miRNA in different types of human neoplasias, suggesting that they play a key role in tumorigenesis (17). It has been previously demonstrated that miR-15a and miR16-1 are expressed at low levels in pituitary adenomas. Their expression correlates inversely with tumor diameter and directly with the secretion of the antineoplastic cytokine p43 (18). Other studies have shown alterations of miRNA expression in pituitary adenomas (19–21). In particular, it has been recently reported that 52 miRNA were differentially expressed in GH adenomas and normal pituitaries. Several of these miRNA may be involved in cell proliferation, apoptosis, and cancer development and progression (22).

To identify miRNA potentially involved in the pathogenesis of GH adenomas, we have analyzed the miRNA expression profile of 12 human GH adenomas vs. normal pituitary gland. Interestingly, five of the most down-regulated miRNA have as targets *E2F*, *HMGA1*, and *HMGA2* genes, all of which are already known to play a critical role in pituitary tumorigenesis.

Materials and Methods

Tissue collection and RNA isolation

Pituitary adenomas were obtained from patients operated at E Jouannau Service de Neurochirurgie U300, Groupement

Hospitalier Est Hospices Civils de Lyon. For each tumor, some fragments were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction. Other fragments were fixed in Bouin-Holland fluid and embedded in paraffin for pathological diagnosis, including immunocytochemistry. Tumors were classified according to the 2004 World Health Organization classification into sparsely or densely granulated adenomas and GH or GH-PRL adenomas. Age, sex, and clinical and hormonal data of the patients and the pathological characteristic of GH adenomas analyzed for miRNACHIP are summarized in Supplemental Table 1 (published on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://jcem.endojournals.org>). We declare that informed consent for the scientific use of biological material was obtained from all patients.

Total RNA isolation from human pulverized tumors was performed with TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. RNA from human normal pituitary glands were used as control. Normal pituitaries were obtained from autopsies of two females and one male, aged from 40–50 yr, and devoid of endocrine diseases.

miRNACHIP microarray

RNA labeling, hybridization on miRNA microarray chip, and microarray analysis were performed as previously described (23). Differentially expressed miRNA in pituitary adenoma tissue samples were analyzed by class comparison using Student's *t* test procedure. Microarray data were analyzed also by significance analysis of microarray test (for more details see Supplemental Information). Each sample was analyzed for miRNA expression profile in triplicate (24).

Bioinformatic prediction of miRNA target genes

Genes potentially targeted by the selected miRNA were identified by using different tools available online such as TargetScan (www.targetscan.org) and miRanda (www.microrna.org). For more details see Supplemental Information.

Reverse transcription and quantitative real-time (qRT)-PCR

Reverse transcription and qRT-PCR for mature miRNA were performed according to manufacturer's instructions of miScript system kits (QIAGEN, Valencia, CA) (for more details see Supplemental Information). qRT-PCR analyses for *HMGA1*, *HMGA2*, and *E2F1* were performed as previously described (13). To calculate the relative expression levels we used the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method (25). Primers for glucose-6-phosphate dehydrogenase (*G6PD*) were used for normalization. The primers used to amplify the above mentioned genes are reported in Supplemental Information.

Cell lines and transfection

GH3, HP75, MEG01, and HEK-293 and transfection methods are described in Supplemental Information.

Western blotting and antibodies

Western blot analysis was performed as previously described (8), and the membranes were incubated with antibodies against E2F1 (C-20; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), α -tubulin (SC-8035; Santa Cruz), β -actin (SC-1615; Santa Cruz), and

anti-HMGA1 and anti-HMGA2 antibodies, all previously described (13, 26).

Luciferase target assays

Cells were cotransfected with the modified firefly luciferase vectors described in Supplemental Information, along with the renilla luciferase reporter plasmid and the miRNA oligonucleotides. Firefly and renilla luciferase activities were measured 24 h after transfection with the dual-luciferase reporter assay system (Promega, Madison, WI). Firefly activity was normalized to renilla activity as control of transfection efficiency.

Growth curve assay

Cells were plated in six-well plates and transfected with 50 nmol/ml pre-miR miRNA precursor or scrambled oligonucleotide using siPORT neoFX. Cells were counted in triplicate at daily intervals with a Burkert hemocytometer chamber.

Colony-forming assay

Cells were transfected with the pMIRNA expression vectors or the backbone vector, along with the pBabe-puro construct expressing the puromycin-resistance gene. Transfected cells were selected by using 1 mg/ml puromycin diluted in the medium used for culture. After 15 d, cells were fixed and stained with 0.1% crystal violet in 20% methanol, and resulting colonies were counted.

Flow cytometry

After trypsinization, cells were washed in PBS and fixed in 70% ethanol. Staining for DNA content was performed with 2 μ g/ml propidium iodide and 20 μ g/ml ribonuclease A for 30 min. For each measure, 30,000 events have been analyzed. We used a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) that was interfaced with a Hewlett-Packard computer (Palo Alto, CA). Cell cycle data were analyzed with the CELL-FIT program (Becton Dickinson).

Statistical analysis

Student's *t* test was used to determine the significance for all the quantitative experiments. All error bars represent the SEM. Statistical significance for all the tests, assessed by calculating the *P* value, was <0.05.

Results

miRNA expression profile of GH-secreting pituitary adenomas

We used a miRNACHIP microarray (23) to evaluate the miRNA expression profile of 12 GH adenomas vs. that of three normal pituitary glands. Eleven patients presented with a GH-secreting adenoma with clinical and hormonal signs of acromegaly, one with a silent GH adenoma. The clinical and hormonal data and the histological features of the tumors are summarized in Supplemental Table 1. By applying biostatistical analysis (see *Materials and Methods*), we obtained a list of miRNA differentially expressed ($P < 0.05$) between normal pituitary and GH adenomas (Table 1). Eighteen miRNA were down-regulated with at least a 2-fold change in the neoplastic tissues compared with the normal gland. Conversely, only one miRNA, the miR-320, was overexpressed (with a 13.3-fold change) in GH adenomas, compared with normal pituitary. To validate the results obtained by microarray Chip, we analyzed the expression of eight down-regulated miRNA (miR-34b, miR-326, miR-374b, miR-432, miR-548c-3p, miR-570, miR-603, and miR-633) and the only one up-regulated (miR-320) by qRT-

TABLE 1. miRNA expression profile of GH-secreting pituitary adenomas vs. normal pituitary

	Geometric mean of intensities In pituitary adenomas	Geometric mean of intensities In normal pituitary	Fold change	miRNA unique ID
1	1339.7274209	100.6376509	13.3123876	hsa-miR-320
2	61.0039988	923.4445835	0.0660614	hsa-miR-633
3	554.5981341	4446.917357	0.1247152	hsa-miR-657
4	77.3976401	835.2207126	0.0926673	hsa-miR-663
5	60.6623332	360.2462431	0.1683913	hsa-miR-432
6	93.443452	1320.8216198	0.0707465	hsa-miR-801
7	182.2341266	2893.0851269	0.0629895	hsa-miR-326
8	75.8028902	510.8846675	0.1483757	hsa-miR-585
9	217.0307216	2713.6989391	0.079976	hsa-miR-374b
10	101.5571388	617.4486958	0.1644787	hsa-miR-548b-3p
11	88.1968279	574.4133742	0.1535424	hsa-miR-603
12	9485.5552871	46998.85725	0.2018252	hsa-miR-483-3p
13	74.4222971	331.8440313	0.2242689	hsa-miR-592
14	58.8817238	202.0629337	0.2914029	hsa-miR-561
15	102.7756863	520.9925122	0.197269	hsa-miR-26b
16	230.1809093	1728.076057	0.1332007	hsa-miR-548c-3p
17	4629.3477853	17850.1685191	0.2593448	hsa-miR-636
18	1259.1293869	4979.3184131	0.2528718	hsa-miR-570
19	71.5553155	228.773205	0.3127784	hsa-miR-34b

The microarray experiment was performed twice using the same RNA samples. The threshold value used to screen up- and down-regulated miRNA was more than 2-fold or less than 0.5-fold change.

PCR on a larger set of tumoral samples (18 GH adenomas, 12 of which were already used for the microarray). As shown in Fig. 1A, a drastic down-regulation of miR-34b, miR-326, miR-374b, miR-432, miR-548c-3p,

miR-570, miR-603, and miR-633 was observed in GH adenomas in comparison with normal pituitary tissues. As far as the miR-320 expression is concerned, it was highly up-regulated in nine of 18 samples, whereas no

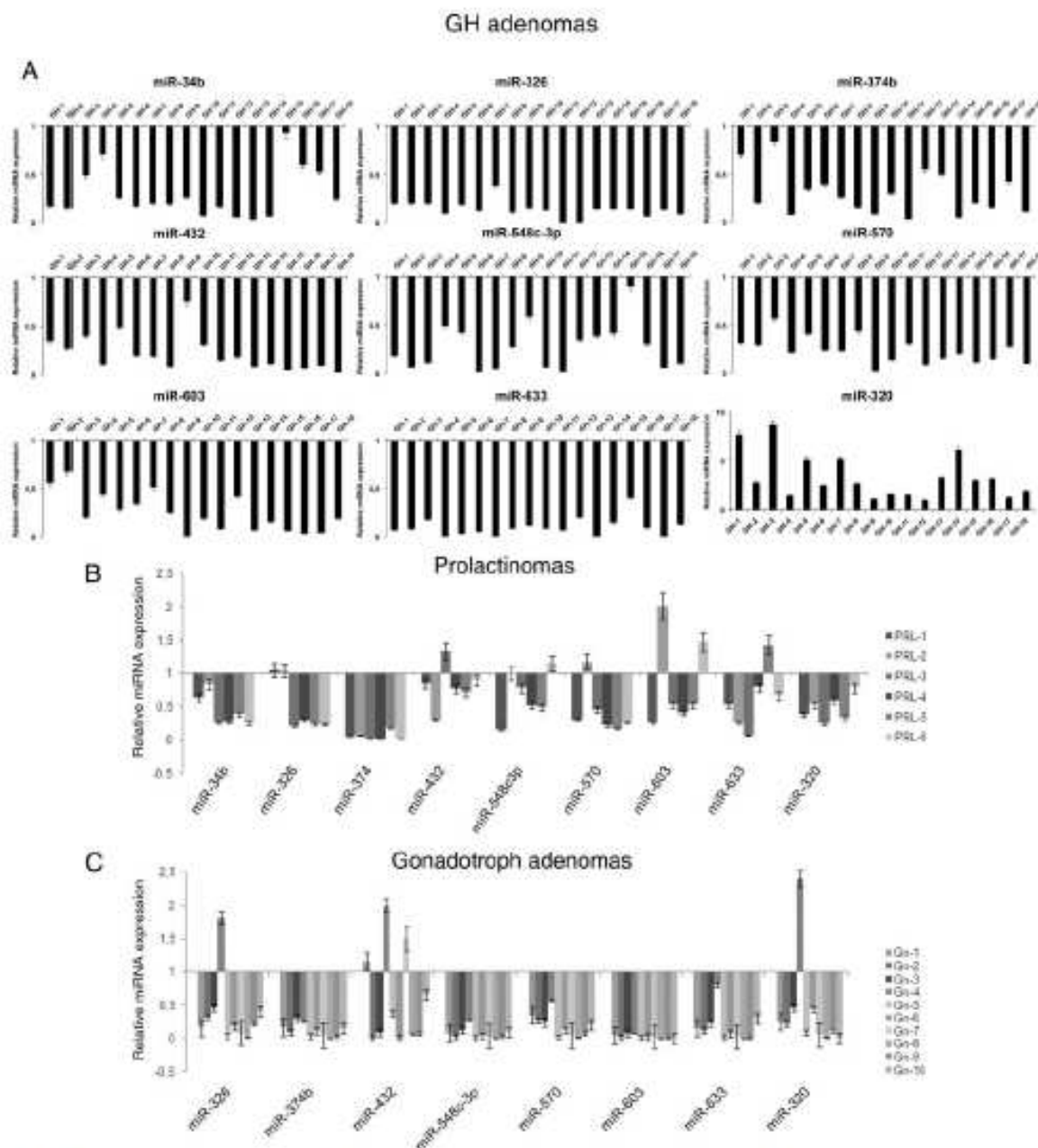


FIG. 1. Analysis of miR-326, miR-374b, miR-432, miR-548c-3p, miR-570, miR-603, miR-633, and miR-320 expression in pituitary adenomas by qRT-PCR. The relative expression values indicate the relative change in the expression levels between GH adenoma (A), PRL adenoma (B), or gonadotroph adenoma (C) samples vs. three normal pituitary samples, assuming that the mean value of the normal samples was equal to 1. The range of variability of the expression of these miRNA in normal pituitary tissues is less than 10%. Each bar represents the mean value \pm SE from three independent experiments performed in triplicate.

or a weak up-regulation was observed in the other adenoma samples.

Next, we investigated whether the altered expression of these miRNA was specific for GH histotype or a more general event in pituitary tumors. Therefore, we examined their expression in six PRL adenoma and in 10 gonadotroph adenoma samples by qRT-PCR. As shown in Fig. 1, B and C, almost all of the analyzed miRNA showed the same expression pattern both in PRL and gonadotroph adenomas with the exception of a few cases. Surprisingly, miR-320 was drastically down-regulated in PRL and gonadotroph adenomas, whereas it was highly up-regulated in GH adenomas.

Identification of the target genes for the miRNA down-regulated in GH adenomas

Using bioinformatic tools (miRanda and TargetScan) to search for potential targets of the above identified miRNA, we identified several genes that could be targeted by them. Interestingly, we found that three of these miRNA (miR-326, miR-432, and miR-570) potentially target the *HMGA2* gene, two miRNA (miR-34b and miR-548c-3p) have both the *HMGAI* and *HMGA2* genes as predicted targets, and the other two (miR-326 and miR-603) are predicted to regulate *E2F1* (Supplemental Table 2). We focused on these targets because it has been previously demonstrated that *HMGAI* and *HMGA2* are overexpressed in most of the human pituitary adenomas (8, 12) and that transgenic mice overexpressing these genes developed mixed PRL/GH pituitary adenomas (11). It is also well known that increased E2F1 activity or expression can lead to pituitary tumorigenesis (13, 27, 28).

In Fig. 2, A and B, we report the miRNA-targeting sites on *HMGAI* and *HMGA2* 3'-UTR, respectively. To validate the influence of the identified miRNA on the expression of *HMGA* genes, we transfected them into MEG-01 and HEK-293 cells, which express significant levels of both *HMGAI* and *HMGA2*, searching for changes in *HMGAI/2* protein levels. The expression levels of the transfected miRNA are reported in Supplemental Fig. 1. Transfection of miR-34b and miR-548c-3p decreased both *HMGAI* and *HMGA2* protein levels, whereas miR-326, miR-432, and miR-570 overexpression resulted in the decrease of *HMGA2* protein levels only (Fig. 2C and Supplemental Fig. 2A) compared with the scrambled-transfected cells. Interestingly, changes in *HMGAI* and/or *HMGA2* mRNA levels, even though quite moderate, were observed in cells transfected with miR-548c-3p, miR-432, and miR-570 (Fig. 2D and Supplemental Fig. 2B), suggesting that these miRNA act, at least in part, through *HMGAI/2* mRNA degradation.

Conversely, no changes in *HMGAI* and *HMGA2* mRNA levels were detected after transfection with miR-34b and miR-326, thus excluding their role in *HMGAI/2* mRNA degradation.

To demonstrate that the direct interaction between the analyzed miRNA and the *HMGAI* and *HMGA2* mRNA was responsible for protein level decrease, we inserted the 3'-UTR of *HMGAI* and *HMGA2* mRNA downstream of the luciferase open reading frame, either in sense (Luc-*HMGAI*-3'-UTR and Luc-*HMGA2*-3'-UTR) or in antisense (Luc-*HMGAI*rev-3'-UTR and Luc-*HMGA2*rev-3'-UTR) orientation. These reporter vectors were transfected in MEG-01 cells together with miRNA oligonucleotide precursors or a scrambled oligonucleotide. As shown in Fig. 2E, the luciferase activity of the Luc-sense-3'-UTR constructs was markedly diminished after transfection of each analyzed miRNA compared with the scrambled, whereas the luciferase activity of Luc-antisense-3'-UTR constructs did not vary, indicating that these miRNA interfere with *HMGAI* and *HMGA2* translation through direct interaction with their 3'-UTR. Moreover, we also performed luciferase assays using 3'-UTR constructs of *HMGAI* and *HMGA2* in which we deleted the seed sequence of miR-548c-3p and miR-326, respectively. Our results show that both *HMGAI* and *HMGA2* 3'-UTR deletion mutants were not affected by miR-548c-3p or miR-326 transfection (Supplemental Fig. 2C).

As described above, *E2F1* was one of the predicted targets for miR-326 and miR-603. The miRNA-targeting sites on *E2F1* 3'-UTR are represented in Fig. 3A. To validate *E2F1* as target for miR-326 and miR-603, we transfected these miRNA into MEG-01 cells, and quantification of *E2F1* protein and mRNA levels was performed by Western blot and qRT-PCR, respectively. As shown in Fig. 3B, transfection of miR-326 and miR-603 decreased *E2F1* protein levels with respect to the scrambled-transfected cells. A reduction of mRNA levels was also observed indicating that miR-326 and miR-603 regulate *E2F1* protein levels also through *E2F1* mRNA degradation (Fig. 3C). Similar results were obtained by transfecting HEK-293 cells (Supplemental Fig. 3, A and B). To validate the direct inhibition of *E2F1* protein by these miRNA, we inserted 3'-UTR of the *E2F1* mRNA either in sense or in antisense orientation (Luc-*E2F1*-3'-UTR and Luc-*E2F1*rev-3'-UTR) downstream of the luciferase open reading frame, and reporter vectors were transfected into MEG-01 cells along with oligonucleotide precursors of miR-326 and miR-603. As shown in Fig. 3D, overexpression of the predicted *E2F1*-targeting miRNA significantly reduced luciferase activity of the Luc sense construct, but not Luc antisense

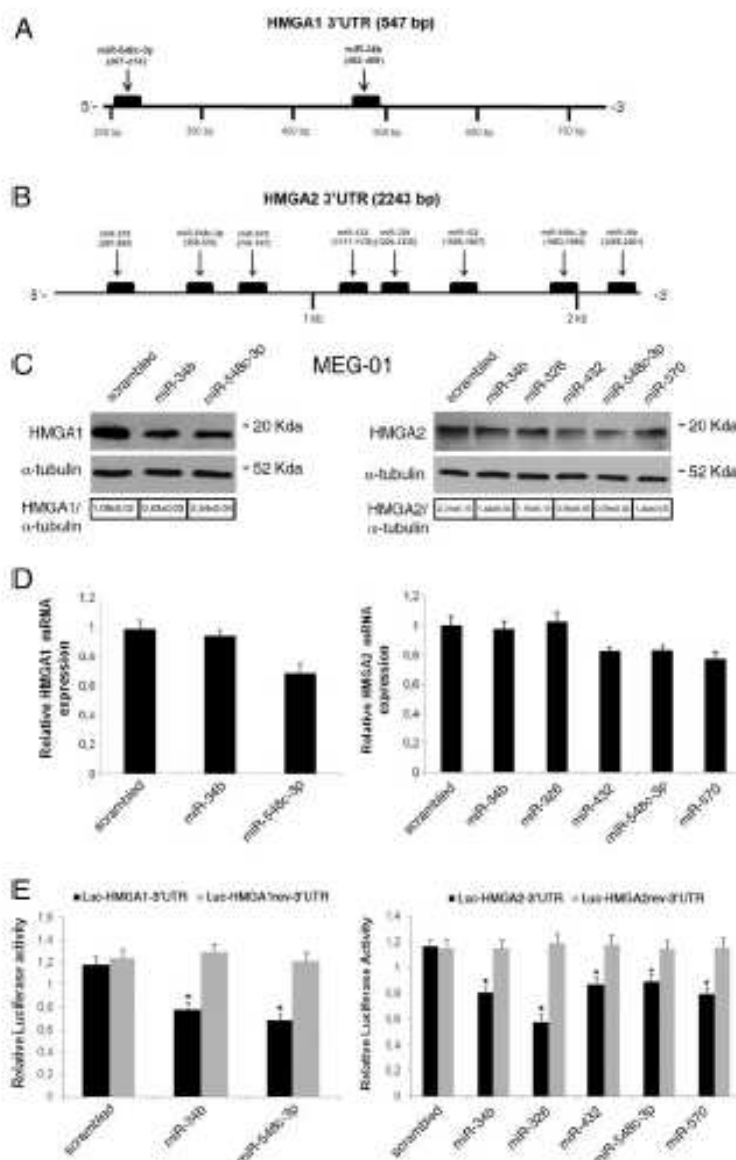


FIG. 2. miR-34b, miR-326, miR-432, miR-548c-3p, and miR-570 target HMGA1 and HMGA2. **A** and **B**, Schematic representation of human HMGA1 and HMGA2 3'-UTR and the relative position of the predicted miRNA-binding sites. **C**, Western blot analysis of HMGA1 (left panel) and HMGA2 (right panel) protein levels in MEG-01 cells transfected with indicated miRNA precursors or scrambled oligonucleotide. α -Tubulin was analyzed as loading control. A representative experiment is shown. The mean \pm SE of densitometric analysis performed on three different experiments, using ImageJ software and normalizing to the α -tubulin, is reported on the bottom. **D**, qRT-PCR analysis of HMGA1 (left panel) and HMGA2 (right panel) mRNA in the same samples shown in **C**. Relative expression values indicate the relative change in HMGA1 and HMGA2 mRNA expression levels between miR-treated and scrambled oligonucleotide-treated cells, normalized with GAPD. The error bars represent the mean \pm SE of three independent experiments performed in triplicate. **E**, Relative luciferase activity in MEG-01 cells transiently transfected with Luc-HMGA1-3'-UTR and Luc-HMGA1-rev-3'-UTR (left panel) or Luc-HMGA2-3'-UTR and Luc-HMGA2-rev-3'-UTR (right panel) along with the indicated miRNA oligonucleotides or with a no-targeting scrambled oligonucleotide. The relative activity of firefly luciferase expression was standardized to a transfection control, using renilla luciferase. The scale bars represent the mean \pm SE of three independent experiments performed in triplicate. *, $P < 0.05$ compared with scrambled transfected cells.

construct, indicating that the inhibition of E2F1 protein expression by these miRNA was dependent on their direct binding to its 3'-UTR. These results were further supported by similar experiments, in which we used the Luc-E2F1-3'-UTR-carrying deletion in the seed sequences of miR-326 and miR-603. These reporter vectors were not affected by miR-326 and miR-603 transfection, demonstrating that the inhibitory activity of these miRNA on E2F1 expression is dependent on their direct interaction with their binding sites on E2F1 3'-UTR (Supplemental Fig. 3, C and D).

The miRNA down-regulated in GH adenomas inhibit cell proliferation

To understand the role of miRNA down-regulation in pituitary tumorigenesis, we analyzed their effects on cell proliferation, performing cell growth curves using HP75 pituitary adenoma cells transiently transfected with miR-34b, miR-326, miR-432, miR-548c-3p, miR-570, miR-603, or scrambled oligonucleotide. As shown in Fig. 4A, a significant reduction of cell number was observed 96 h after transfection with the selected miRNA compared with scrambled-transfected cells. Similar results were also obtained when rat GH3 pituitary tumor cells were transfected with miR-326, miR-432, miR-548c-3p, miR-570, or scrambled oligonucleotide (Fig. 4B). Because miR-34b and miR-603 targeting sites on HMGA and E2F1 3'-UTR are not conserved in rat, their effects were not analyzed in these cells. Moreover, the inhibitory role of the analyzed miRNA on cell growth was also demonstrated by a growth curve performed on human HEK-293 cells (Supplemental Fig. 4A).

Next, we performed a colony-forming assay on GH3 cells (Fig. 4C) after transfection with pMIRNA expression vector carrying miR-326 precursor and on MEG-01 cells (Fig. 4D) after transfection with pMIRNA expression vectors carrying miR-34b and miR-326 precursors along with

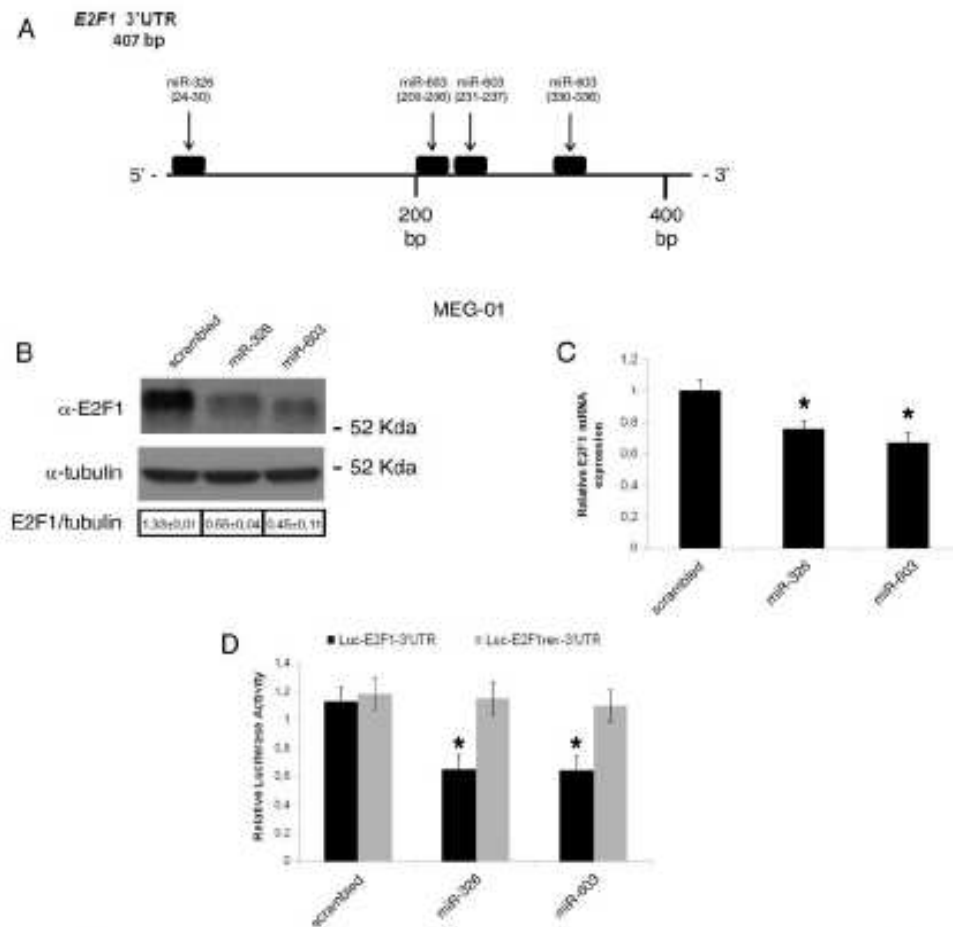


FIG. 3. miR-326 and miR-603 target E2F1. **A**, Schematic representation of the 3'-UTR sites of the *E2F1* gene targeted by miR-326 and miR-603. **B**, Western blots of the E2F1 protein expression in MEG-01 cells transfected with miR-326, miR-603, and a scrambled oligonucleotide. α -Tubulin was analyzed as loading control. A representative experiment is shown. The mean \pm SE of densitometric analysis performed on three different experiments, using ImageJ software and normalizing to the α -tubulin, is reported on the bottom. **C**, qRT-PCR analysis of *E2F1* mRNA in the same samples shown in **B**. Relative expression values indicate the relative change in *E2F1* mRNA expression levels between miRNA-treated and scrambled oligonucleotide-treated cells, normalized with *G6PD*. The error bars represent the mean \pm SE. *, $P < 0.05$ compared with scrambled transfected cells. **D**, Relative luciferase activity in MEG-01 cells transiently transfected with Luc-E2F1-3'-UTR and Luc-E2F1rev-3'-UTR along with miR-326 and miR-603 oligonucleotide. A no-targeting scrambled oligonucleotide was used as a control. The relative activity of firefly luciferase expression was standardized to a transfection control, using renilla luciferase. The scale bars represent the mean \pm SE of three independent experiments performed in triplicate. *, $P < 0.05$ compared with scrambled transfected cells.

pBABE-puro-expressing gene for the resistance to puromycin. We focused our attention on these miRNA because miR-34b was predicted to down-regulate both *HMGA1* and *HMGA2* mRNA, and miR-326 was predicted to target both *HMGA2* and *E2F1* mRNA. As control of the pBABE-puro transfection efficiency in the presence of pMIRNA or backbone vectors, we also transfected cells with pMIRNA expression vector carrying miR-887 that does not have matching sequences in the 3'-UTR of *HMGA1*, *HMGA2*, and *E2F1* and does not have as predicted target genes coding for protein involved in cell

growth regulation. As shown in Fig. 4, C and D, cells transfected with miR-34b and miR-326 generated a lower number of colonies in comparison with the same cells transfected with the backbone vector or the pMIRNA-887, thus confirming the negative role of these miRNA in the regulation of cell growth.

Finally, to better characterize the effects of the analyzed miRNA on cell cycle progression, miRNA precursors or scrambled oligonucleotide were transfected on GH3 (Fig. 4E), MEG-01 (Fig. 4F), and HEK-293 cells (Supplemental Fig. 4B) and analyzed by flow cytometry.

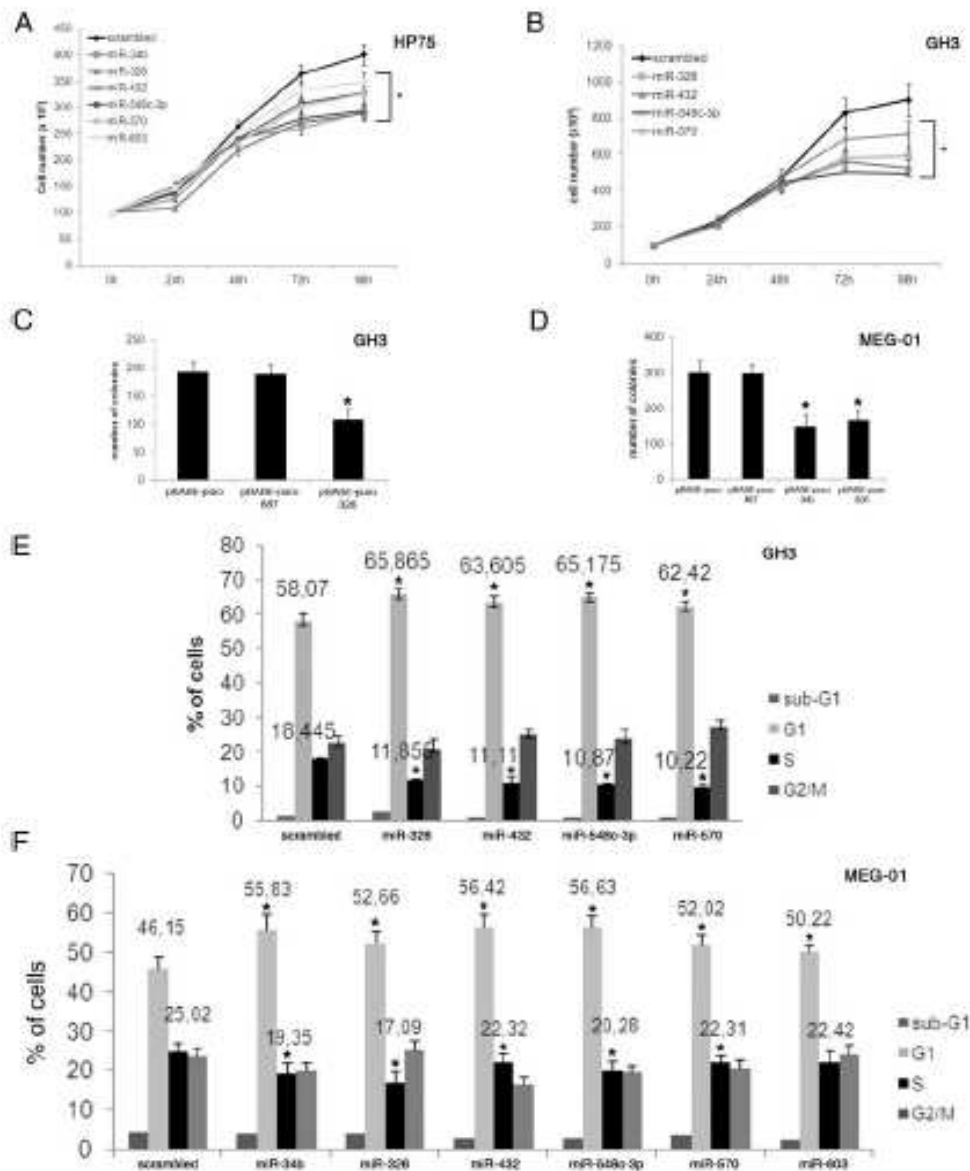


FIG. 4. miR-34b, miR-326, miR-432, miR-548c-3p, miR-570, and miR-603 inhibit cell proliferation. A and B, Cell growth curves of HP75 (A) and GH3 (B) cells transfected with miR-34b, miR-326, miR-432, miR-548c-3p, miR-570, and miR-603 and counted each 24 h for 96 h after plating. The y-axis represents absolute viable cell count. The mean \pm SE of three independent experiments is reported. *, $P < 0.05$ at 96 h compared with scrambled transfected cells. C and D, Colony-forming assay performed on GH3 (C) and MEG-01 (D) cells transfected with a vector expressing miR-34b, miR-326, or miR-887 under the transcriptional control of the CMV promoter. The empty vector was used as a control. Reported results are the mean of two independent experiments performed in triplicate, and error bars show SE. *, $P < 0.05$ compared with empty vector-transfected cells. E and F, Flow cytometric analysis of GH3 (E) and MEG-01 (F) cells transfected with the indicated miRNA precursors or scrambled oligonucleotide. After transfection, the DNA of the transfected cells was analyzed 72 h later by flow cytometry after propidium iodide staining. The percentage of cells in G1 and S phase is also reported. Each bar represents the mean \pm SE from three independent experiments performed in triplicate. *, $P < 0.05$ compared with scrambled transfected cells.

Interestingly, miRNA-transfected cells displayed an increase in the G1-phase population and a decrease in the S-phase compared with scrambled-transfected cells. These results indicate that the overexpression of these

miRNA affects the G1-S transition of the cell cycle progression, as expected by their targets (*HMGAI*, *HMGAI2*, and *E2F1*), known to be involved in the regulation of this phase of the cell cycle.

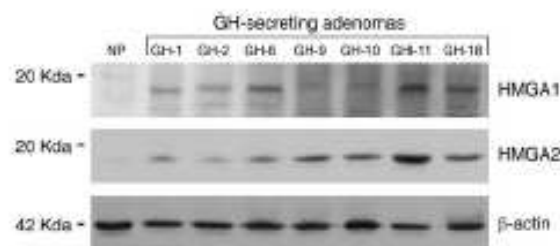


FIG. 5. HMGA1 and HMGA2 protein expression is inversely correlated with miRNA expression in GH adenomas compared with normal pituitary (NP), as shown by Western blot analysis of HMGA1 and HMGA2 protein expression. The level of β -actin was used as loading control.

Inverse correlation between miRNA expression and HMGA1/2 expression

To verify whether miRNA down-regulation might have a role also *in vivo* in the process of pituitary tumorigenesis, we analyzed HMGA1 and HMGA2 expression in some GH adenomas by Western blot. As shown in Fig. 5, increased HMGA1 and HMGA2 protein levels, in comparison with normal pituitary, were observed in all GH adenomas analyzed, all of which showed a decreased miRNA expression (Fig. 1A) in comparison with normal pituitary tissue. These data suggest that there may be an inverse correlation between miRNA down-regulation and HMGA1/2 expression.

Discussion

To investigate the possible role of alterations of miRNA expression in GH adenomas, we analyzed the miRNA expression profile of 12 GH adenomas in comparison with the normal pituitary gland by microarray analysis. Nineteen miRNA were identified as differentially expressed between pituitary adenomas and normal pituitary with a significant (>2-fold) change. We focused our attention on eight of the down-regulated miRNA because they were predicted to target *HMGA1*, *HMGA2*, and/or *E2F1* genes. Interestingly, these miRNA were also down-regulated in another six GH adenoma samples and in a large majority of PRL and gonadotroph adenomas tested, suggesting that their down-regulation might represent a general event in pituitary tumorigenesis. However, the validation of this hypothesis requires the analysis of a higher number of PRL and gonadotroph adenoma samples, because only a limited number of these tumors were analyzed in our study. Subsequently, we focused on the miRNA that had as target genes *HMGA1*, *HMGA2*, and *E2F1*, whose role in pituitary tumorigenesis has been already demonstrated. Interestingly, three of these miRNA (miR-326, miR-432, and miR-570) have *HMGA2* as a target, two

miRNA (miR-34b and miR-548c-3p) have both the *HMGA1* and *HMGA2* genes as targets, and the other two miRNA (miR-326 and miR-603) have *E2F1* as a target. Therefore, the down-regulation of these miRNA may account for the increased HMGA and E2F1 protein levels observed in pituitary adenomas. This appears extremely interesting because *HMGA2* overexpression, after amplification and/or rearrangement of the *HMGA2* gene associated with trisomy of chromosome 12, where the *HMGA2* gene is located, has been frequently observed in PRL adenomas (12). Moreover, high protein levels of HMGA2 have been correlated with invasion, tumor size, and higher Ki-67 index in PRL, silent ACTH, and gonadotropin adenomas (29). Consequently, the down-regulation of the miRNA targeting *HMGA2* might synergize with *HMGA2* gene alterations in the induction of high expression levels of HMGA2 protein in pituitary adenomas. Accordingly, we report an inverse correlation between HMGA1/2 protein levels and the expression of the analyzed miRNA in GH adenomas. This down-regulation could, at least partially, account for the HMGA2 overexpression in pituitary adenomas where no genomic *HMGA2* alterations have been observed, because it occurs for most of the human nonfunctioning pituitary adenomas, which rarely harbor trisomy of chromosome 12 (30). Certainly, the down-regulation of miR-34b and miR-548c-3p, both targeting *HMGA1*, could account for the overexpression of HMGA1 protein detected in most human pituitary adenomas (13) in the absence of any alteration of the *HMGA1* gene locus.

Among the miRNA down-regulated in GH adenomas, two target *E2F1*. Also in this case, the increased E2F1 levels could have a role in pituitary tumorigenesis. Indeed, mice carrying a germline mutation of one Rb allele, causing an increase in the E2F1 activity, are highly predisposed to develop pituitary tumors (31), and this occurs also in mice with impaired function of p27 or p18, which both converge on pRB (32, 33). Moreover, the induction of the E2F1 activity plays a critical role also in the pituitary adenomas induced in transgenic mice overexpressing *Hmga1* or *Hmga2* (13).

Functional studies validated a role for the down-regulation of these miRNA in tumorigenesis. Indeed, the overexpression of the selected miRNA inhibited cell growth. Moreover, fluorescence-activated cell sorting analysis demonstrated that, consistent with the identified targets, these miRNA retain the cells in the G1 phase of the cell cycle. The results reported here are consistent with a recent study of our group showing that five miRNA targeting the *HMGA1* and *HMGA2* genes are down-regulated in human pituitary adenomas (34).

As mentioned in the introductory section, the miRNA expression profile of GH adenoma has been already re-

ported (19, 22). These studies reveal different down-regulated miRNA but do not show conflicting results. The differences between these studies may depend on 1) a different miRNA platform used for miRNA screening and 2) pharmacological treatment preceding the surgical intervention. Our microarray data were analyzed also by significance analysis of microarray test, a more stringent statistical technique for determining whether changes in gene or miRNA expression are statistically significant (for more details see Supplemental Information). Therefore, it is likely that, given the selectivity of our statistical analysis, our system has excluded some miRNA that have been previously identified as altered in GH adenomas. Of interest is the finding, in the study of Mao *et al.* (22) that miR-126 and miR-381 are down-regulated in GH adenomas. The target of these miRNA is the *PTTG* gene, which is overexpressed in most pituitary adenomas and is involved in multiple cellular pathways including proliferation, transformation, and angiogenesis (35, 36). Nevertheless, there are some common findings between our data and the ones previously published; miR-801 appears down-regulated in GH adenomas also in the work by Mao *et al.* (22), whereas miR-26 is reported as down-regulated in the study of Bottoni *et al.* (19).

It is worth noting that our study, as other ones analyzing RNA and miRNA expression profile in pituitary adenomas, do not use, for technical reasons, the appropriate control that should be represented by normal somatotrophs. However, the validity of our findings is supported by the demonstration that our selected down-regulated miRNA seem to have a role in pituitary tumorigenesis because they are able to regulate the growth of pituitary adenoma cells.

In conclusion, we report the identification of miRNA drastically and constantly down-regulated in GH adenomas. Because these miRNA target genes, such as *HMG1*, *HMG2*, and *E2F1*, whose overexpression and/or activation plays a critical role in pituitary tumorigenesis, it is reasonable to conclude that their down-regulation might contribute to this process, suggesting an approach to the therapy of pituitary adenomas based on the restoration of the down-regulated miRNA.

Acknowledgments

We thank Mario Berardone for the artwork.

Address all correspondence and requests for reprints to: Alfredo Fusco, Istituto di Endocrinologia ed Oncologia Sperimentale del CNR, via Pansini 5, 80131 Napoli, Italy. E-mail: alfusco@unina.it; or Jacqueline Trouillas, INSERM U1028, Faculté de Médecine Lyon-Est, rue G. Paradin F-69372 Lyon cedex 08, France. E-mail: jacqueline.trouillas@univ-lyon1.fr.

This work was supported by grants from AIRC (Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro) (IG 5346) and the Ministero dell'Università e della Ricerca Scientifica e Tecnologica (PRIN 2008). The French team was supported by grants from le Ministère de la Santé (Program Hospitalier de Recherche Clinique National no. 27-43) and la ligue contre le Cancer Rhône-Alpes. D.D. is a recipient of a fellowship from Fondazione Italiana per la Ricerca sul Cancro.

Disclosure Summary: The authors declare no conflict of interest.

References

- Kovacs K, Horvath E 1986 Pathology of growth hormone-producing tumors of the human pituitary. *Semin Diagn Pathol* 3:18–33
- Mosnon JP 2000 The epidemiology of endocrine tumours. *Endocr Relat Cancer* 7:29–36
- Lopes MB 2010 Growth hormone-secreting adenomas: pathology and cell biology. *Neurosurg Focus* 29:E2
- Johnson KR, Lehn DA, Reeves R 1989 Alternative processing of mRNA encoding mammalian chromosomal high-mobility-group proteins HMG-I and HMG-Y. *Mol Cell Biol* 9:2114–2123
- Nagpal S, Ghosh C, DiSepio D, Molina Y, Sutter M, Klein ES, Chandraratna RA 1999 Retinoid-dependent recruitment of a histone H1 displacement activity by retinoic acid receptor. *J Biol Chem* 274:22563–22568
- Thanos D, Maniatis T 1992 The high mobility group protein HMG I(Y) is required for NF- κ B-dependent virus induction of the human IFN- β gene. *Cell* 71:777–789
- Thanos D, Du W, Maniatis T 1993 The high mobility group protein HMG I(Y) is an essential structural component of a virus-inducible enhancer complex. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 58:73–81
- De Martino I, Visone R, Wierinckx A, Palmieri D, Ferraro A, Cappabianca P, Chiappetta G, Forzati F, Lombardi G, Colao A, Trouillas J, Fedele M, Fusco A 2009 HMGA proteins up-regulate CCNB2 gene in mouse and human pituitary adenomas. *Cancer Res* 69:1844–1850
- Fusco A, Fedele M 2007 Roles of HMGA proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 7:899–910
- Fedele M, Battista S, Kenyon L, Baldassarre G, Fidanza V, Klein-Szanto AJ, Parlow AF, Visone R, Pierantoni GM, Outwater E, Santoro M, Croce CM, Fusco A 2002 Overexpression of the *HMGA2* gene in transgenic mice leads to the onset of pituitary adenomas. *Oncogene* 21:3190–3198
- Fedele M, Pentimalli F, Baldassarre G, Battista S, Klein-Szanto AJ, Kenyon L, Visone R, De Martino I, Ciarmiello A, Arra C, Viglietto G, Croce CM, Fusco A 2005 Transgenic mice overexpressing the wild-type form of the *HMG1* gene develop mixed growth hormone/prolactin cell pituitary adenomas and natural killer cell lymphomas. *Oncogene* 24:3427–3435
- Findli P, Pierantoni GM, Giardino D, Losa M, Rodeschini O, Fedele M, Valtorta E, Mortini P, Croce CM, Larizza L, Fusco A 2002 The high mobility group A2 gene is amplified and overexpressed in human prolactinomas. *Cancer Res* 62:2398–2405
- Fedele M, Visone R, De Martino I, Troncone G, Palmieri D, Battista S, Ciarmiello A, Pallante P, Arra C, Melillo RM, Helin K, Croce CM, Fusco A 2006 HMGA2 induces pituitary tumorigenesis by enhancing E2F1 activity. *Cancer Cell* 9:459–471
- Bartel DP 2004 MicroRNA: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281–297
- Miska EA 2005 How microRNA control cell division, differentiation and death. *Curr Opin Genet Dev* 15:563–568
- Zamore PD, Haley B 2005 Ribo-gnome: the big world of small RNA. *Science* 309:1519–1524
- Fabbri M, Croce CM, Calin GA 2008 MicroRNA. *Cancer J* 14:1–6

18. Bottoni A, Piccin D, Tagliati F, Luchin A, Zatelli MC, degli Uberti EC 2005 miR-15a and miR-16-1 down-regulation in pituitary adenomas. *J Cell Physiol* 204:280–285
19. Bottoni A, Zatelli MC, Ferracin M, Tagliati F, Piccin D, Vignali C, Calin GA, Negrini M, Croce CM, Degli Uberti EC 2007 Identification of differentially expressed microRNA by microarray: a possible role for microRNA genes in pituitary adenomas. *J Cell Physiol* 210:370–377
20. Amaral FC, Torres N, Saggioro F, Nader L, Machado HR, Silva Jr WA, Moreira AC, Castro M 2009 MicroRNA differentially expressed in ACTH-secreting pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 94:320–323
21. Butz H, Lékó I, Cziráj S, Igaz P, Korbonits M, Rácz K, Patócs A 2011 MicroRNA profile indicates downregulation of the TGF β s pathway in sporadic non-functioning pituitary adenomas. *Pituitary* 14:112–124
22. Mao ZG, He DS, Zhou J, Yao B, Xiao WW, Chen CH, Zhu YH, Wang HJ 2010 Differential expression of microRNA in GH-secreting pituitary adenomas. *Diagn Pathol* 5:79
23. Liu CG, Calin GA, Meloon B, Gamliel N, Sevignani C, Ferracin M, Dumitru CD, Shimizu M, Zupo S, Dono M, Alder H, Bullrich F, Negrini M, Croce CM 2004 An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:9740–9744
24. Pichiorri F, Suh SS, Rocci A, De Luca L, Taccioli C, Santhanam R, Zhou W, Benson Jr DM, Hofmanster C, Alder H, Garofalo M, Di Leva G, Volinia S, Lin HJ, Perrotti D, Kuehl M, Aqeilan RI, Palumbo A, Croce CM 2010 Downregulation of p53-inducible microRNA 192, 194, and 215 impairs the p53/MDM2 autoregulatory loop in multiple myeloma development. *Cancer Cell* 18:367–381
25. Livak KJ, Schmittgen TD 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 25:402–408
26. Pierantoni GM, Fedele M, Pentimalli F, Benvenuto G, Pero R, Viglietto G, Santoro M, Chiarotti L, Fusco A 2001 High mobility group 1 (Y) proteins bind HIPK2, a serine-threonine kinase protein which inhibits cell growth. *Oncogene* 20:6132–6141
27. Pei L, Melmed S, Scheithauer B, Kovacs K, Benedict WF, Prager D 1995 Frequent loss of heterozygosity at the retinoblastoma susceptibility gene (Rb) locus in aggressive pituitary tumors: evidence for a chromosome 13 tumor suppressor gene other than Rb. *Cancer Res* 55:1613–1616
28. Yamasaki I, Bronson R, Williams BO, Dyson NJ, Harlow E, Jacks T 1998 Loss of E2F-1 reduces tumorigenesis and extends the lifespan of Rb1^{+/−} mice. *Nat Genet* 18:360–364
29. Qian ZR, Asa SL, Siomi H, Siomi MC, Yoshimoto K, Yamada S, Wang EL, Rahman MM, Inoue H, Itakura M, Kudo E, Sano T 2009 Overexpression of HMGA2 relates to reduction of the let-7 and its relationship to clinicopathological features in pituitary adenomas. *Mod Pathol* 22:431–441
30. Pierantoni GM, Finelli P, Valtorta E, Giardino D, Rodeschini O, Esposito F, Lusa M, Fusco A, Larizza I 2005 High-mobility group A2 gene expression is frequently induced in non-functioning pituitary adenomas (NFPAs), even in the absence of chromosome 12 polysomy. *Endocr Relat Cancer* 12:867–874
31. Jacks T, Fazeli A, Schmitt EM, Bronson RT, Goodell MA, Weinberg RA 1992 Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* 359:295–300
32. Fero MI, Rivkin M, Tasch M, Porter P, Carow CE, Firpo E, Polyak K, Tsai LH, Broudy V, Perlmutter RM, Kaushansky K, Roberts JM 1996 A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell* 85:733–744
33. Franklin DS, Godfrey VL, Lee H, Kovalev GI, Schoonhoven R, Chen-Kiang S, Su L, Xiong Y 1998 CDK inhibitors p18(INK4c) and p27(Kip1) mediate two separate pathways to collaboratively suppress pituitary tumorigenesis. *Genes Dev* 12:2899–2911
34. Palmieri D, D'Angelo D, Valentino T, De Martino I, Ferraro A, Wierinckx A, Fedele M, Trouillas J, Fusco A 5 December 2011 Downregulation of HMGA-targeting microRNA has a critical role in human pituitary tumorigenesis. *Oncogene* 10.1038/onc.2011.557
35. Heaney AP, Horwitz GA, Wang Z, Singson R, Melmed S 1999 Early involvement of estrogen-induced pituitary tumor transforming gene and fibroblast growth factor expression in prolactinoma pathogenesis. *Nat Med* 5:1317–1321
36. Ishikawa H, Heaney AP, Yu R, Horwitz GA, Melmed S 2001 Human pituitary tumor-transforming gene induces angiogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 86:867–874