



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E INNOVAZIONE TECNOLOGICA

Corso di Laurea Magistrale in Biologia

Tesi di Laurea

Titolo

Inibizione del miR-214 per contrastare la progressione dell'osteosarcoma e migliorare la risposta alla terapia

Candidato: Federico Tolino 

Relatore: Prof.ssa Francesca Orso 

Anno Accademico 2023/2024

INDICE

1.INTRODUZIONE	5
1.1 OSTEOSARCOMA	5
1.1.1 Epidemiologia ed eziologia	6
1.1.2 Sintomi e terapia	7
1.2 MicroRNA (miRNA)	9
1.2.1 Biogenesi dei miRNA	9
1.2.2 Meccanismo di regolazione post-trascrizionale dei miRNA	11
1.2.3 Ruolo dei miRNA nei tumori	13
1.2.4 Ruolo dei miRNA nell'osteosarcoma	13
1.2.5 Approcci terapeutici basati sui miRNA	16
1.3 MiRNA 214 (miR-214)	18
1.3.1 Il ruolo del miR-214 nei tumori	19
1.3.2 Il ruolo del miR-214 nell'osteosarcoma	21
2. OBIETTIVO DELLO STUDIO	23
3. MATERIALI E METODI	24
3.1 Colture cellulari	24
3.2 Trasfezione delle cellule.	24
3.3 Estrazione dell'RNA e qRT-PCR	27
3.4 Proliferazione e vitalità cellulare	28
3.5 Motilità cellulare mediante valutazione della abilità di riparare la ferita o “wound healing”	29
3.6 Migrazione cellulare	30
3.7 Analisi di sopravvivenza	30
3.8 Predizione dei farmaci	30
3.9 Analisi statistica	30
4. RISULTATI	31
4.1 Il miR-214 promuove la progressione dell'OS ed è implicato nella risposta alla terapia	31
4.2 Generazione di un modello cellulare delecto (“knock-out”) del gene Hsa-miR-214 mediante il sistema CRISPR-Cas9	34

4.3 L'inibizione dell'espressione del miR-214 ("knock-down") in combinazione con il metotrexato non mostra alcun vantaggio nell'inibire la proliferazione nelle cellule di OS.	37
4.4 L'inibizione dell'espressione del miR-214 ("knock-down") in combinazione con il metotrexato non mostra alcun vantaggio nel bloccare la motilità delle cellule di OS.	42
5. DISCUSSIONE	46
6. CONCLUSIONI	50
7. BIBLIOGRAFIA	51

1.INTRODUZIONE

1.1 OSTEOSARCOMA

L'osteosarcoma (OS), pur essendo un tumore raro è il tumore primario delle ossa più comune e presenta due picchi di incidenza negli adolescenti (18 anni) e negli adulti (>60 anni) (Beird et al., 2022). L'OS può svilupparsi in tutte le ossa del corpo, ma i siti più comuni di insorgenza sono le aree in prossimità delle ginocchia e la porzione prossimale dell'omero (Bielack et al., 2016) (Figura 1). Si tratta di una neoplasia che può colpire anche pazienti che hanno già sviluppato un tumore nella loro storia clinica, in questo caso si parla di OS secondario. I meccanismi patofisiologici coinvolgono diverse mutazioni genetiche che sono strettamente connesse con la formazione del tessuto osseo. I pazienti a cui viene diagnosticato un tumore localizzato presentano un tasso di sopravvivenza definito "libero dalla malattia" che si attesta intorno al 60%, mentre per i pazienti a cui sono state diagnosticate delle metastasi la percentuale si riduce al 30% (Beird et al., 2022).

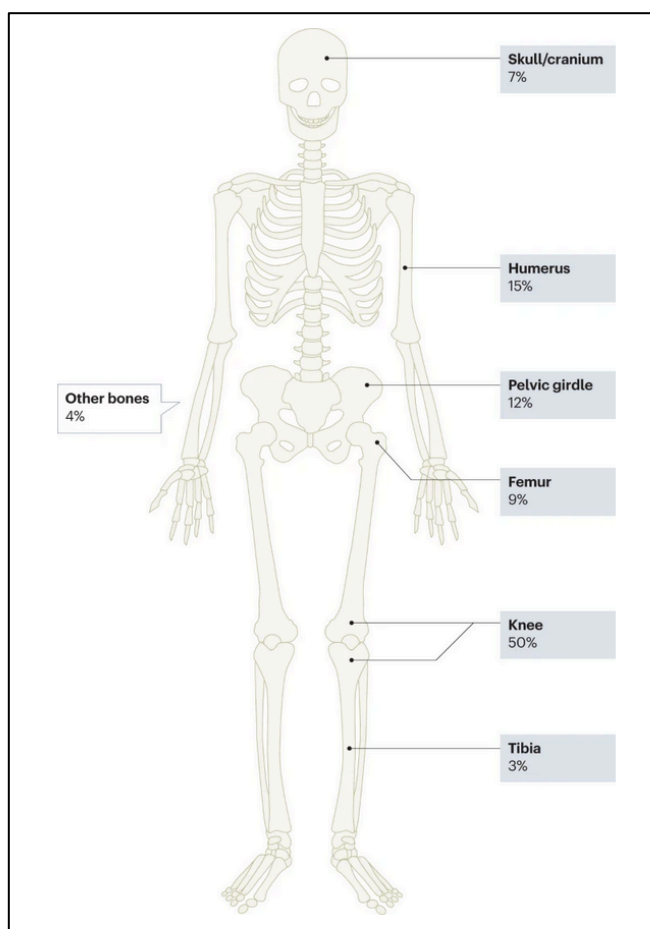


Figura 1. **Siti anatomici dello sviluppo dell'osteosarcoma** (Beird et al., 2022). La probabilità di sviluppare un OS nei diversi distretti è pari a: 7% cranio, 15% omero, 12% pelvi, 9% femore, 50% ginocchio, 3% tibia e il restante 4% nelle altre ossa del corpo.

In merito alla stadiazione, gli OS possono essere suddivisi in tre gruppi principali: basso grado, grado intermedio e alto grado (Bertoni and Bacchini, 1998). Il grado del tumore indica il rischio di sviluppare una forma metastatica. Gli OS di basso grado o parostale, sono tipicamente indolenti e vengono trattati esclusivamente con la rimozione chirurgica, al contrario i tumori ad alto grado presentano un rischio elevato di sviluppare metastasi nei polmoni, nei linfonodi e in altre ossa del corpo (Isakoff et al., 2015; Kager et al., 2003), richiedendo così un trattamento basato sulla chirurgia associata a chemioterapia adiuvante.

1.1.1 Epidemiologia ed eziologia

L'OS ha un'incidenza negli adolescenti pari a 3-4,5 casi per milione di persone all'anno (Mirabello et al., 2009). È lievemente più comune negli individui maschi, con un rapporto Maschio:Femmina di 1,4:1. Nei pazienti adulti (> 60 anni) si osserva una diminuzione (2 milioni di persone all'anno) dell'incidenza rispetto agli individui giovani (6,7 milioni casi all'anno in pazienti < 24 anni), ma questa è accompagnata da una prognosi infausta rispetto ai giovani pazienti e leggermente sfavorevole negli individui maschi rispetto ai soggetti di sesso femminile (Cole et al., 2022).

L'OS è definito istologicamente come un tumore delle cellule produttrici di osteoidi, che spesso si trovano accompagnate ad una varietà di cellule adipogeniche, muscolari, fibroblastiche e condroblastiche (Klein and Siegal, 2006). Questo fenotipo microscopico ha a lungo alimentato l'ipotesi che l'OS derivi da un precursore mesenchimale multipotente. Le osservazioni epidemiologiche supportano questa ipotesi, infatti si è riscontrato che i tumori insorgono più frequentemente all'interno delle metafisi delle ossa lunghe nei bambini, adolescenti e giovani adulti durante i periodi di picco di crescita lineare, suggerendo che il tessuto osseo e le cellule produttrici di cartilagine che proliferano rapidamente durante questi scatti di crescita siano quelle suscettibili alla trasformazione dando origine all'OS (Jones, 2011; Mutsaers and Walkley, 2014).

La maggior parte dei casi di OS è sporadica, ma una piccola parte di essi è da attribuirsi ad una predisposizione genetica. Esistono delle patologie in grado di aumentare il rischio di sviluppare questo tumore, ad esempio: la sindrome di Li-Fraumeni, il retinoblastoma ereditario e l'anemia di Diamond-Blackfan. Altre cause di predisposizione sono patologie dovute a difetti della DNA elicasi primaria che coinvolgono la famiglia di

RECQ (RecQ DNA helicase family), tra queste troviamo la sindrome di Rothmund-Thomson, la sindrome di Rapadilino, la sindrome di Bloom e la sindrome di Werner (Lu et al., 2020; Vlachos et al., 2012; Wang et al., 2003). L'età di esordio per questi tumori sindrome-associati è più precoce rispetto agli individui con casi sporadici. Pazienti con retinoblastoma e sindrome di Rothmund-Thomson possono sviluppare l'OS durante l'adolescenza, mentre l'OS associato alla sindrome di Werner o sindrome di Li-Fraumeni si manifesta ad un'età intermedia (Calvert et al., 2012; Hameed and Mandelker, 2018). Le varianti autosomiche dominanti più comunemente osservate nei pazienti con OS sono a carico di geni soppressori tumorali TP53 (proteina tumorale 53) associati alla sindrome di Li-Fraumeni e RB1 (retinoblastoma 1). Altre varianti di patogenicità sono state osservate nei geni di suscettibilità al cancro, tra cui principalmente APC (Adenomatous Polyposis Coli), MSH2 (DNA mismatch repair protein 2), PALB2 (Partner And Localizer Of BRCA2), CDKN2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A), MEN1(Multiple endocrine neoplasia type 1), VHL (von Hippel-Lindau) e ATRX (alpha-thalassemia/mental retardation, X-linked) (Mirabello et al., 2020), infine le interazioni poligeniche possono spiegare l'associazione tra altezza dell'individuo e rischio di OS (Mirabello et al., 2011).

1.1.2 Sintomi e terapia

I pazienti a cui viene diagnosticato l'OS spesso presentano dolore persistente alle estremità che si acutizza specialmente durante la notte (Zhou et al., 2017). Nello stesso punto in cui è presente il dolore spesso si associa anche il sintomo di gonfiore. La perdita dell'integrità strutturale dovuta dall'osteolisi causata dal tumore mette spesso il soggetto a rischio di fratture. Circa il 10% dei pazienti affetti da OS manifestano fratture, complicando così il quadro nella gestione della patologia (Papagelopoulos et al., 2000).

Fino al 1980, la sola terapia disponibile per l'OS era quella basata sulla sola asportazione chirurgica della massa tumorale. Progressi terapeutici sono stati raggiunti con l'introduzione della chemioterapia sistemica che fu inizialmente somministrata in fase neoadiuvante (Chou et al., 2009). Numerosi studi che utilizzano un approccio combinato di chemioterapia neoadiuvante e chirurgia hanno mostrato tassi di sopravvivenza "libera da malattia" a lungo termine compresi tra il 60 e il 70% in pazienti giovani con malattia apparentemente localizzata. Doxorubicina, metotrexato ad alte dosi in associazione a leucovorina, cisplatino e ifosfamida si sono affermati come i chemioterapici più attivi nell'OS, sia come terapia neoadiuvante che adiuvante. I regimi più efficaci impiegano

almeno tre di questi farmaci, mentre l'aggiunta di un quarto agente chemioterapico sembrerebbe non portare ad ulteriori benefici (Brard et al., 2019).

Un approccio utilizzato regolarmente nella cura contro l'OS è il regime terapeutico neoadiuvante MAP, chiamato così per via della somministrazione di metotrexato (M) ad alta dose, doxorubicina (A) e cisplatino (P) come standard di trattamento. Questa scelta è supportata e basata su uno studio prospettico randomizzato effettuato su larga scala chiamato EURAMOS-1 (Bielack et al., 2015; Meazza and Asaftei, 2021). Questo studio ha dimostrato inequivocabilmente che i risultati a lungo termine non potevano essere ulteriormente migliorati mediante modifiche del trattamento postoperatorio per i pazienti con scarsa risposta. I pazienti randomizzati e non randomizzati a tale terapia di salvataggio avevano tassi di sopravvivenza libera da eventi rispettivamente del 53% (intervallo di confidenza al 95% 47-53%) e del 55% (intervallo di confidenza al 95% 49-60%).

I pazienti con OS non resecabile o ampiamente metastatico ritenuti incurabili vengono generalmente gestiti con gli stessi protocolli terapeutici sistemici, tra cui la chemioterapia MAP e il controllo locale del tumore, ciò nonostante per questo approccio terapeutico l'esito è molto sfavorevole con < 30% dei pazienti in grado di sopravvivere a lungo termine (Kager et al., 2003).

Non esiste una terapia sistemica standard per i pazienti di età superiore a 40 anni e sono presenti pochi studi clinici a supporto della pratica clinica. Le linee guida presenti ad oggi suggeriscono che i pazienti adulti (> 40 anni) dovrebbero essere trattati in modo simile ai pazienti pediatrici e ai giovani adulti. Tuttavia, in questi pazienti è possibile attuare dei regimi personalizzati, soprattutto per quanto riguarda il metotrexato ad alte dosi. Analisi retrospettive della Società Europea di Oncologia Muscoloscheletrica su pazienti di età superiore ai 40 anni hanno dimostrato che i pazienti adulti possono trarre beneficio da un trattamento aggressivo con chirurgia e chemioterapia (Ruggieri et al., 2013). Lo studio EURO-B.O.S.S ha dimostrato una probabilità di sopravvivenza a 5 anni favorevole nel 66% (95% CI 57–75%) di pazienti con malattia localizzata sottoposti a chemioterapia intensiva multi-agente che includeva dosi attenuate di metotrexato (Tate et al., 2015). Tuttavia, sono stati osservati notevoli effetti tossici correlati alla chemioterapia come ad esempio la neutropenia e altri effetti ematologici avversi (Beird et al., 2022).

1.2 MicroRNA (miRNA)

I microRNA (miRNA) sono delle sequenze di RNA che presentano una lunghezza che si attesta intorno ai 20-22 nucleotidi. Sono degli RNA non codificanti in quanto non vengono tradotti in proteine, ma svolgono un ruolo chiave nella regolazione dell'espressione genica agendo a livello post-trascrizionale.

1.2.1 Biogenesi dei miRNA

I geni dei miRNA sono trascritti dalla RNA polimerasi II (Pol II) e il lungo trascritto primario ha una struttura a forcina in cui le sequenze di miRNA sono incorporate. Circa la metà di tutti i miRNA attualmente identificati sono intragenici e trascritti principalmente da introni e relativamente pochi da sequenze esoniche di geni codificanti per proteine. Il resto dei miRNA sono intergenici, trascritti indipendentemente da un gene ospite e regolati dai loro propri promotori (The FANTOM Consortium et al., 2017). Spesso, diverse sequenze codificanti per i miRNA sono vicine tra loro, costituendo così un'unità di trascrizione policistronica. I miRNA presenti nello stesso *locus* sono generalmente cotrascritti, ma i singoli miRNA possono essere regolati ulteriormente a livello post-trascrizionale (Lee, 2002; Tanzer and Stadler, 2004). La biogenesi del miRNA può avvenire secondo la via canonica e non canonica (Figura 2).

La via canonica è la via principale con cui i miRNA vengono prodotti. In questa via, i pri-miRNA sono trascritti dai loro geni e poi processati in pre-miRNA dal complesso del microprocessore, costituito principalmente da una proteina che lega l'RNA DiGeorge Syndrome Critical Region 8 (DGCR8) e un enzima ribonucleasi III chiamato Drosha (Denli et al., 2004). DGCR8 riconosce un N6-metiladenilato GGAC e altri motivi all'interno del pri-miRNA (Alarcón et al., 2015), mentre Drosha taglia il pri-miRNA duplex alla base della sua caratteristica struttura a forcina di pri-miRNA. Una volta che i pre-miRNA sono generati, essi sono trasportati al citoplasma da un complesso di esportina 5 (XPO5)/RanGTP e poi processati dall'endonucleasi III del RNasi Dicer (Okada et al., 2009). Questo fenomeno ha come esito la rimozione del "loop" terminale, dando così origine al miRNA "duplex" maturo. La direzionalità del filamento del miRNA determina il nome della forma matura. Il filamento 5p deriva dall'estremità 5' a forcina del pre-miRNA mentre il filamento 3p proviene dall'estremità 3'. Entrambi i filamenti derivati dal miRNA "duplex" maturo possono essere caricati dalla famiglia di proteine Argonaute (AGO) (AGO1-4 negli esseri umani) in modo ATP-dipendente (Yoda et al., 2010). La selezione del filamento 5p o 3p si

basa in parte sulla stabilità termodinamica dell'estremità 5' del miRNA "duplex" o di un uracile in posizione 1 sul 5' terminale. In generale, per il caricamento del miRNA duplex sulle proteine AGO viene preferita l'estremità 5' con stabilità più bassa o l'uracile al 5', il cosiddetto filamento guida. Il filamento non caricato viene chiamato filamento passeggero. I filamenti passeggeri del miRNA che non contengono errori sono tagliati da AGO2 e degradati da meccanismi cellulari, viceversa qualora ci fossero degli errori questi ultimi verranno srotolati e degradati passivamente senza l'ausilio di AGO2.

Ad oggi, sono state dimostrate molteplici vie non canoniche di biogenesi dei miRNA. Queste vie fanno uso di combinazioni differenti delle proteine presenti nella via canonica, principalmente Drosha, Dicer, esportina 5 e AGO2. In generale, la biogenesi non canonica del miRNA può essere raggruppata nelle vie indipendenti Drosha/DGCR8 e Dicer-indipendenti. I pre-miRNA prodotti dal Drosha/DGCR8-via indipendente assomigliano ai substrati di Dicer. Un esempio di tali pre-miRNA sono i Mirtroni, che sono prodotti dagli introni del mRNA durante la giunzione (Babiarz et al., 2008). Un altro esempio è il cap 7-metilguanosina (m7G) del pre-miRNA. Questi RNA sono esportati direttamente dal nucleo al citoplasma attraverso l'esportina senza bisogno dell'aiuto di Drosha (Xie et al., 2013). Dall'altro lato, i miRNA Dicer-indipendenti sono elaborati da Drosha dalle trascrizioni endogene degli "short hairpin" RNA (shRNA). Questi pre-miRNAs richiedono AGO2 per completare la loro maturazione all'interno del citoplasma perché sono di lunghezza insufficiente per essere substrati di Dicer (Yang et al., 2010). Questo a sua volta promuove il carico dell'intero pre-miRNA in AGO2 e nel meccanismo AGO2-dipendente del filamento 3p. Il taglio 3'-5' del filamento 5p completa la loro maturazione (Cheloufi et al., 2010).

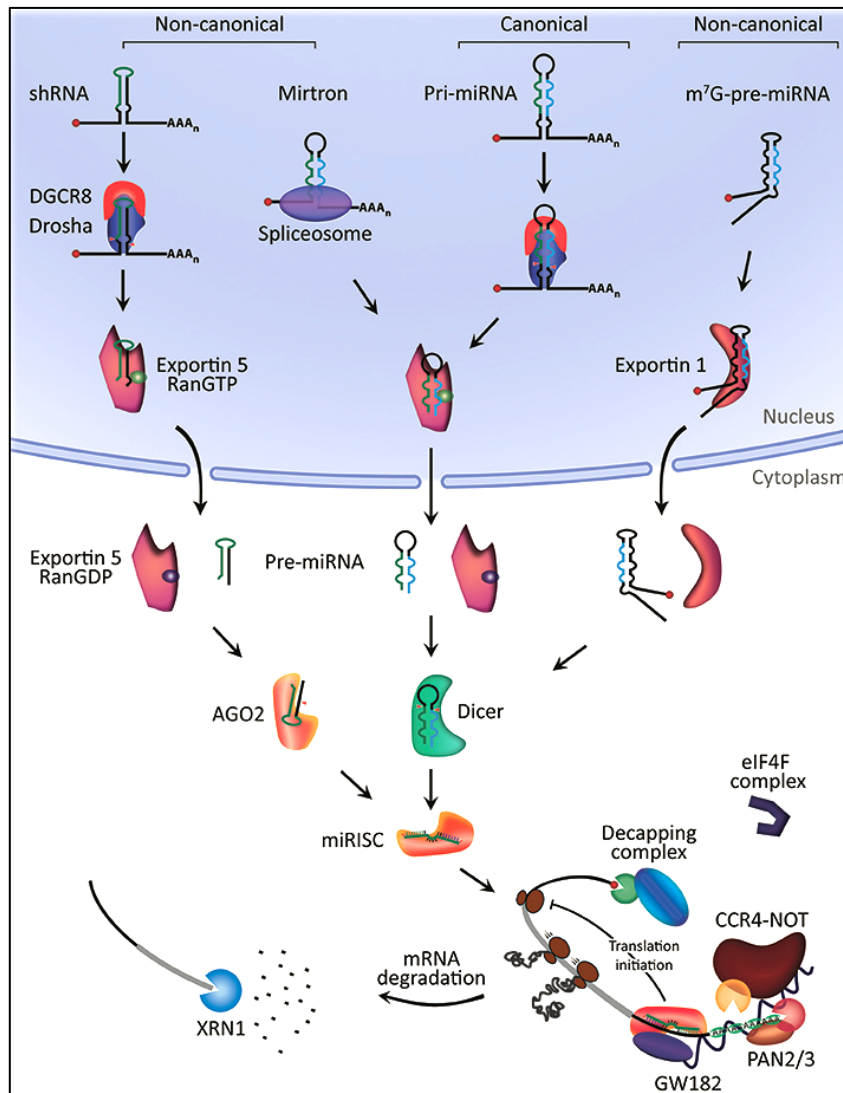


Figura 2. Le vie di biogenesi dei miRNA. La via canonica inizia con il pri-miRNA, scisso dal complesso Drosha-DGCR8 in pre-miRNA. Questo viene esportato nel citoplasma tramite esportina 5/RanGTP e processato in miRNA maturo. Nella via non canonica, gli shRNA sono scissi dal complesso microprocessore ed esportati nel citoplasma tramite esportina 5/RanGTP. Successivamente sono processati da AGO2 in modo indipendente da Dicer. I mirtroni e i pre-miRNA con cappuccio m7G dipendono da Dicer per la maturazione, ma si differenziano nel trasporto nucleocitoplasmatico: i mirtroni usano esportina 5/RanGTP, mentre i m7G-pre-miRNA usano esportina 1 (O'Brien et al., 2018).

1.2.2 Meccanismo di regolazione post-trascrizionale dei miRNA

Una volta trascritti, i miRNA si appaiano con specifici mRNA e regolano finemente la loro traduzione e stabilità. I miRNA, insieme alle proteine AGO formano il complesso RISC (RNA-induced silencing complex). Una volta formato, RISC trova il suo mRNA bersaglio andando in cerca delle sequenze nucleotidiche complementari. La complementarità tra miRNA e mRNA è determinata dalla regione “seed” che è specifica per ogni miRNA. La sequenza “seed” è la regione di 2-8 nucleotidi localizzata più vicino all'estremità 5' del miRNA. Una perfetta complementarità “seed” tra miRNA e mRNA si ha

quando i nucleotidi dei due filamenti si appaiano senza alcuna interruzione. Negli animali, l'estensione dell'appaiamento di basi è di norma di almeno sette coppie di nucleotidi e questo appaiamento avviene molto più frequentemente nella regione della 3' UTR (3'-untranslated region) dell'mRNA bersaglio rispetto alla regione 5' UTR (Zhang and Su, 2009).

Una volta che il miRNA si appaia all'mRNA, possono verificarsi principalmente due scenari: se l'appaiamento di basi è esteso (poco frequente nell'uomo) l'mRNA viene tagliato (fenomeno definito come "slicing") dalla proteina Argonauta che rimuove con efficienza la coda poliadenilata dell'mRNA e lo espone alle esonucleasi. Dopo il taglio dell'mRNA, il complesso RISC con il suo miRNA associato viene rilasciato e può andare ad appaiarsi ad altri mRNA, in questo modo un singolo miRNA può agire su più mRNA bersaglio. Se invece l'appaiamento di basi fra il miRNA e l'mRNA è meno esteso (come osservato per la maggior parte dei miRNA umani), AGO non taglia l'mRNA; piuttosto è la traduzione dell'mRNA che viene repressa e l'mRNA viene inviato verso i "P-body" dove, separato dai ribosomi, va incontro successivamente all'accorciamento della coda poliadenilata, all'eliminazione del cappuccio e alla degradazione (Figura 3).

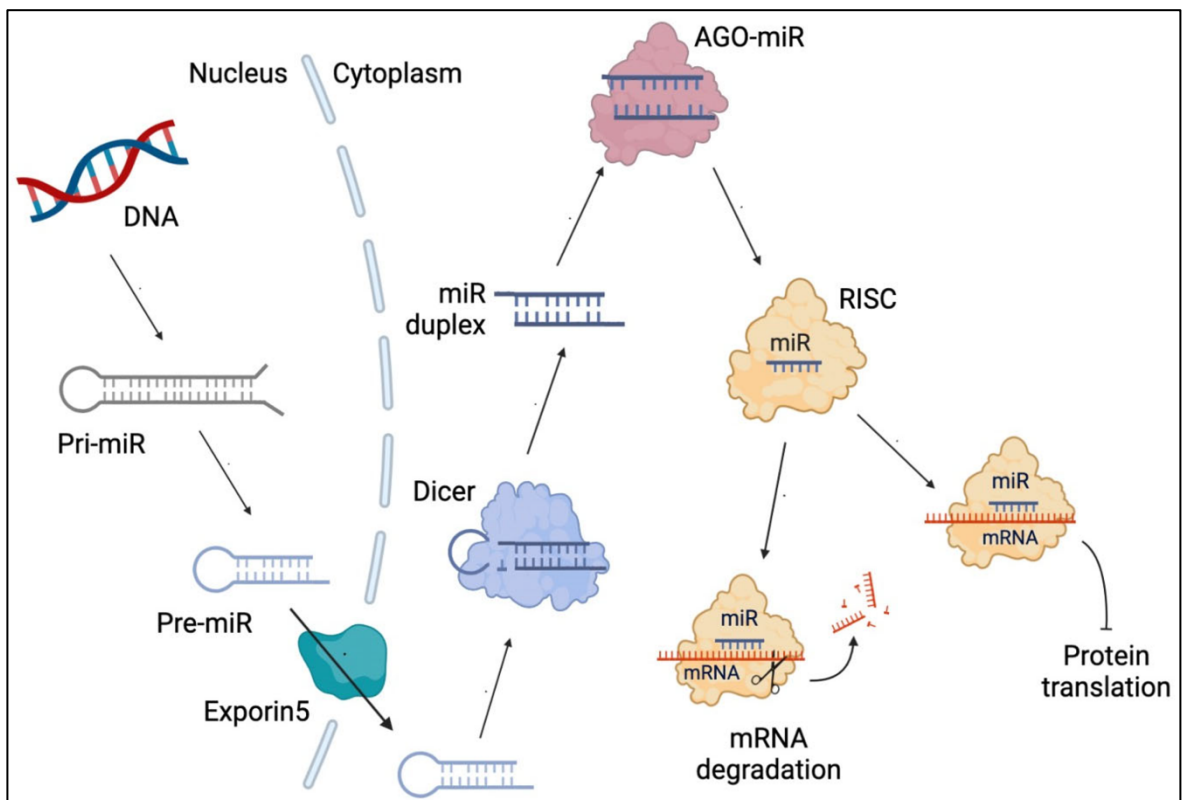


Figura 3. **Meccanismo di regolazione post-trascrizionale dei miRNA.** Se l'appaiamento delle basi tra mRNA e miRNA è perfettamente complementare, l'Argonauta taglia l'mRNA ("slicing") rimuovendo la coda poliadenilata e permettendo la degradazione dell'mRNA da parte delle esonucleasi. In questo modo il complesso RISC con il miRNA può quindi cercare altri mRNA bersaglio. Se invece l'appaiamento non è perfettamente complementare, AGO non taglia l'mRNA, ma inibisce la sua traduzione. (Alfaro et al., 2023)

Esistono molte caratteristiche che rendono i miRNA particolarmente utili come regolatori dell'espressione genica, ad esempio un singolo miRNA può regolare un intero insieme di mRNA diversi purché questi contengano una breve sequenza nelle loro 3'-UTR. Questa situazione è comune nell'uomo, dove un singolo miRNA può avere come bersaglio centinaia di mRNA differenti. La regolazione effettuata dai miRNA può essere combinatoria, infatti più miRNA possono legarsi allo stesso mRNA e cooperare per ridurre l'espressione del gene (Alfaro et al., 2023).

1.2.3 Ruolo dei miRNA nei tumori

L'espressione aberrante dei miRNA è stata correlata con l'insorgenza di numerose patologie, in particolare l'alterazione dell'espressione dei miRNA può causare forme neoplastiche. Analisi condotte su tessuti tumorali hanno dimostrato una disregolazione dal punto di vista dell'espressione dei miRNA rispetto alla loro controparte sana. I miRNA giocano un ruolo chiave anche nelle manifestazioni cliniche dei tumori caratterizzandone il grado, lo stadio, l'aggressività, l'invasività e l'indice di proliferazione (Calin and Croce, 2006). L'espressione della maggior parte dei miRNA risulta ridotta nel tessuto tumorale rispetto al tessuto normale, causando spesso la perdita generale di differenziamento delle cellule neoplastiche (Lu et al., 2005). In accordo con queste osservazioni, la deplezione totale di alcuni miRNA per delezione genetica, favorisce la trasformazione cellulare e la tumorigenesi *in vivo* (Kumar et al., 2009; Lambertz et al., 2010). Questo dimostra come l'alterazione dei miRNA possa rappresentare un evento causativo nello sviluppo del cancro. Sebbene la riduzione generale dei livelli di espressione dei miRNA nei tumori sia la manifestazione più comune, numerosi miRNA con ruolo oncogeno risultano sovra espressi (Volinia et al., 2006). Tali miRNA promuovono tutte le caratteristiche delle cellule maligne, tra cui l'insensibilità ai segnali anti-crescita ("cluster" miR-17/19), l'evasione dell'apoptosi ("cluster" miR-34a), il potenziale replicativo ("cluster" miR-372/373), l'angiogenesi (gruppo miR-210), l'invasione e di conseguenza la disseminazione con annessa formazione di metastasi (gruppo miR-10b) (Di Leva et al., 2014).

1.2.4 Ruolo dei miRNA nell'osteosarcoma

È stato dimostrato come l'origine dell'OS sia dovuta ad un'alterazione del differenziamento cellulare causato principalmente da mutazioni geniche che causano

un'alterazione del differenziamento degli osteoblasti a partire dalle loro cellule progenitrici, le cellule staminali mesenchimali (MSC) (Tang et al., 2008).

Attraverso un'analisi mediante "microarrays", si è visto come numerosi miRNA risultino differenzialmente espressi nei tessuti e nelle cellule di OS suggerendo un loro ruolo chiave nello sviluppo del tumore e nella sua progressione, in particolare nella proliferazione, adesione, invasione e capacità di disseminare.

Come descritto nel paragrafo dedicato all'eziopatogenesi, il ruolo della proteina P53 è fondamentale nel contrastare l'oncogenesi. Una mutazione del gene TP53 è stata associata ad una disregolazione di numerosi miRNA coinvolti a valle del processo di segnalazione cellulare, tra questi ritroviamo miR-34a, miR-34b, miR-34c e miR-31. L'espressione di questi miRNA risulta regolata da P53 in risposta ad un danno del DNA o da "stress" causati da diversi tipi di cancro. Il ricercatore He insieme ai suoi collaboratori ha osservato che i livelli di espressione del miR-34 risultano significativamente ridotti in 117 campioni primari di OS (He et al., 2009). E' stato inoltre osservato come una sovraespressione di miR-34 e miR-199a-3p in cellule di OS sia in grado di bloccare la crescita cellulare e di promuovere l'apoptosi attraverso i geni bersaglio mTOR (mammalian target of rapamycin), c-Met (recettore del fattore di crescita degli epatociti) e MDM4 (proteina inibitrice del gene TP53) (Tian et al., 2014).

Runx2 (Runt-related transcription factor 2) è un fattore di trascrizione osteogenico appartenente alla famiglia runt dei fattori di trascrizione ed è altamente espresso in biopsie e in linee cellulari di OS umano (Martin et al., 2014). È stato riportato che la stabilizzazione di p53 con l'inibitore di MDM2 (Mouse double minute 2 homolog), Nutlin-3, aumenti l'espressione del miR-34c che è in grado di bersagliare Runx2 portando all'inibizione della proliferazione delle cellule di OS (Van Der Deen et al., 2013). La perdita del miR-31 è correlata a difetti nella via di p53 mentre la sua sovraespressione previene drasticamente la proliferazione delle cellule di OS grazie alla regolazione dei geni E2F2 (Early region 2 binding factor 8) e la chinasi ciclina-dipendente 2A (CDKN2A), suggerendo che i casi di OS con inattività di p53 potrebbero trarre beneficio da un trattamento terapeutico basato sulla sovraespressione del miR-31 (Creighton et al., 2010).

È noto come l'attivazione della via di segnalazione PI3K/Akt (phosphatidylinositol 3-kinase/) promuova la proliferazione, l'adesione, la migrazione, l'invasione e la

metastatizzazione in OS (Zhu et al., 2014)(Hou et al., 2014). Numerosi miRNA controllano questa via di segnalazione. La sovraespressione del miR-223 in cellule di OS ha rivelato inibizione della crescita, arresto G0/G1 e apoptosi potenziata. A livello di meccanismo, miR-223 regola in maniera diretta la proteina da shock termico 90B1 (Hsp90B1) causando l'inibizione della via di segnalazione PI3K/Akt/mTOR (G. Li et al., 2012). Un altro studio di Li e colleghi ha mostrato come la riespressione del miR-125b nella linea cellulare di sarcoma di Ewing A673 riduca la proliferazione, la migrazione e l'invasione cellulare, arresti la progressione del ciclo cellulare e stimoli l'apoptosi. Questi ricercatori hanno inoltre scoperto che la sovraespressione del miR-125b diminuiva l'espressione della subunità catalitica delta di PIK3 (PIK3CD), causando una sottoregolazione di PIK3, un abbassamento dell'attività di fosfo-AKT e un ritardo della progressione biologica delle cellule A673 (Li et al., 2014). Questi risultati suggeriscono che il miR-125b funzioni come un soppressore del tumore agendo sulla via di segnalazione PI3K/Akt e che la somministrazione *in vivo* del miR-125b possa avere un potenziale beneficio terapeutico per i pazienti affetti da OS. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per testare questa possibilità. L'omologo della fosfatasi e della tensina eliminato sul cromosoma dieci (PTEN) è un potente regolatore negativo di Akt e svolge un ruolo cruciale nel controllo dell'attivazione della segnalazione di PI3K/Akt (Nakanishi et al., 2014). Alterazione nell'espressione di PTEN può contribuire alla progressione dell'OS. miR-17 è un miRNA oncogeno la cui espressione è frequentemente aumentata nei tessuti e nelle linee cellulari di OS. L'espressione ectopica di miR-17 inibisce PTEN legandosi direttamente al suo 3'-UTR e potenziando così la via PI3K/Akt in OS (Gao et al., 2014). miR-221 induce anche la sopravvivenza cellulare, la resistenza al cisplatino e previene l'apoptosi cellulare regolando direttamente PTEN (G. Zhao et al., 2013). Collettivamente, queste osservazioni indicano che miR-17 e miR-221 sono in grado di regolare direttamente PTEN portando all'induzione del fenotipo maligno dell'OS umano e che questi miRNA potrebbero essere potenziali bersagli per il trattamento dell'OS.

La via di Notch (Neurogenic locus notch homolog protein) è coinvolta nel mantenimento dell'equilibrio tra proliferazione e differenziamento cellulare in numerosi tumori, incluso l'OS (Hughes, 2010). Diversi miRNA agiscono su questa via. È stato osservato che l'inibizione del miR-199b-5p provoca un aumento dei livelli di espressione dei componenti della via Notch. Inoltre, l'espressione di miR-34a e di miR-200b in cellule di OS diminuisce notevolmente l'espressione di Notch1, causando inibizione dell'angiogenesi, della proliferazione cellulare e dell'invasione (Li et al., 2013). Risultati

simili sono stati ottenuti in cellule di OS trasfettate un vettore di espressione per il miR-34a (Yan et al., 2012), inoltre, il miR-34c indotto dalla proteina morfogenetica ossea 2 (BMP2) è in grado di agire direttamente su più componenti della via di segnalazione di Notch, inclusi Notch1, Notch2 e Jag1 (Jagged 1) negli osteoblasti, causando un difetto di proliferazione degli osteoclasti (Bae et al., 2012). In conclusione, la modulazione post-trascrizionale mediata dal miR-34c della via di segnalazione di Notch negli osteoblasti è un possibile meccanismo che regola l'effetto proliferativo di Notch nei progenitori degli osteoblasti (Zhang et al., 2015).

1.2.5 Approcci terapeutici basati sui miRNA

Come descritto precedentemente, i miRNA giocano un ruolo fondamentale nel meccanismo di regolazione del tumore; infatti, alcuni di essi possono agire come oncogeni e altri come oncosoppressori. Gli effetti del guadagno o della perdita di funzione di alcuni miRNA sulle cellule tumorali sono stati dimostrati sia sui tumori solidi sia sui tumori ematologici ed è proprio per questo motivo che negli anni si è cercato di mettere a punto degli approcci terapeutici che modulassero l'attività di queste molecole. I miRNA con capacità oncogena possono essere individuati e silenziati attraverso diverse strategie definite con il termine inglese “knock-down”, ovvero un silenziamento o meglio blocco della loro funzione attraverso anti-miRNA oligonucleotidi (AMO), miRNA spugne o “sponges” e miRNA “masking”. Gli AMO sono degli oligonucleotidi antisenso sintetici che bloccano l'interazione tra il miRNA e l'mRNA bersaglio attraverso un meccanismo di competizione. Gli AMO possiedono delle modificazioni chimiche. I tipi di AMO più comunemente utilizzati sono gli AMO 2'-O-metil, gli AMO 2'-O-metossietil e gli acidi nucleici bloccati (locked nucleic acid, LNA) (Forterre et al., 2020). Gli LNA sono oligonucleotidi modificati che offrono diversi vantaggi rispetto agli AMO convenzionali, tra questi ritroviamo una maggiore stabilità termica e una tossicità ridotta. Queste molecole sono impiegate nella maggior parte degli studi *in vivo* attuali. Tuttavia, come approccio terapeutico, gli AMO presentano alcuni limiti intrinseci, tra cui una durata d'azione limitata e l'incapacità di colpire più di un miRNA contemporaneamente (McDermott et al., 2011).

Poiché i miRNA sono spesso attivi in “cluster” nei processi patologici, la soppressione di più miRNA sovraespressi risulta essere una sfida terapeutica significativa. In questo contesto, il concetto di miRNA “sponge” ovvero miRNA spugne risulta particolarmente

interessante. Questi inibitori competitivi dei miRNA sono trascritti espressi da promotori forti e contengono numerosi siti di legame in “tandem” per i miRNA di interesse. Ebert e collaboratori hanno dimostrato l’efficacia di questi inibitori di miRNA *in vitro* attraverso la trasfezione transitoria di cellule in coltura di vettori che codificano miRNA spugne. E’ stata osservata una riduzione dei livelli dei miRNA bersaglio a livelli comparabili a quelli ottenibili con gli AMO (McDermott et al., 2011). Una singola miRNA “sponge” recante una sequenza “seed” eptamerica può agire su famiglie di miRNA sovraespressi che condividono la stessa sequenza “seed”, in questo modo la “sponge” può modulare efficacemente livelli di espressione anormali determinando così una riduzione del livello dei miRNA bersaglio.

Per quanto riguarda le terapie per i miRNA oncosoppressori, il principio è quello di ripristinare l’espressione di tali miRNA a livelli fisiologici. È quindi necessario aumentare l’espressione di tutti quei miRNA silenziati durante il processo di trasformazione cellulare e far sì che essi possano tornare a svolgere la loro azione di oncosoppressore. Per questo approccio vengono utilizzati i miRNA “mimicry” o “mimics” e i vettori virali che codificano per il miRNA di interesse. I miRNA “mimics” sono piccole molecole di RNA a doppio filamento che mimano e imitano i miRNA endogeni o i loro precursori. Per quanto concerne l’utilizzo dei vettori virali, vengono di solito utilizzati Adenovirus e Lentivirus, con una buona efficienza di traduzione e soprattutto una bassa tossicità (McDermott et al., 2011)..

L’efficacia di questi approcci è stata dimostrata sia *in vivo* che *in vitro*. Veicolare queste terapie alle cellule tumorali è fondamentale per garantire un trattamento efficiente senza danneggiare le cellule sane. Per ottenere una elevata specificità, vengono utilizzate molecole chiamate aptameri in grado di essere altamente selettive e in grado di trasportare proteine, farmaci e acidi nucleici, come i miRNA. Si tratta di una promettente classe di trattamenti antitumorali la cui caratteristica principale è la capacità di riconoscere le cellule bersaglio grazie alla loro struttura tridimensionale (Figura 4). Permettono una somministrazione mirata, mitigando così la tossicità e riducendo gli effetti collaterali dovuti alla sostanza ad essi coniugata (Carrà et al., 2024).

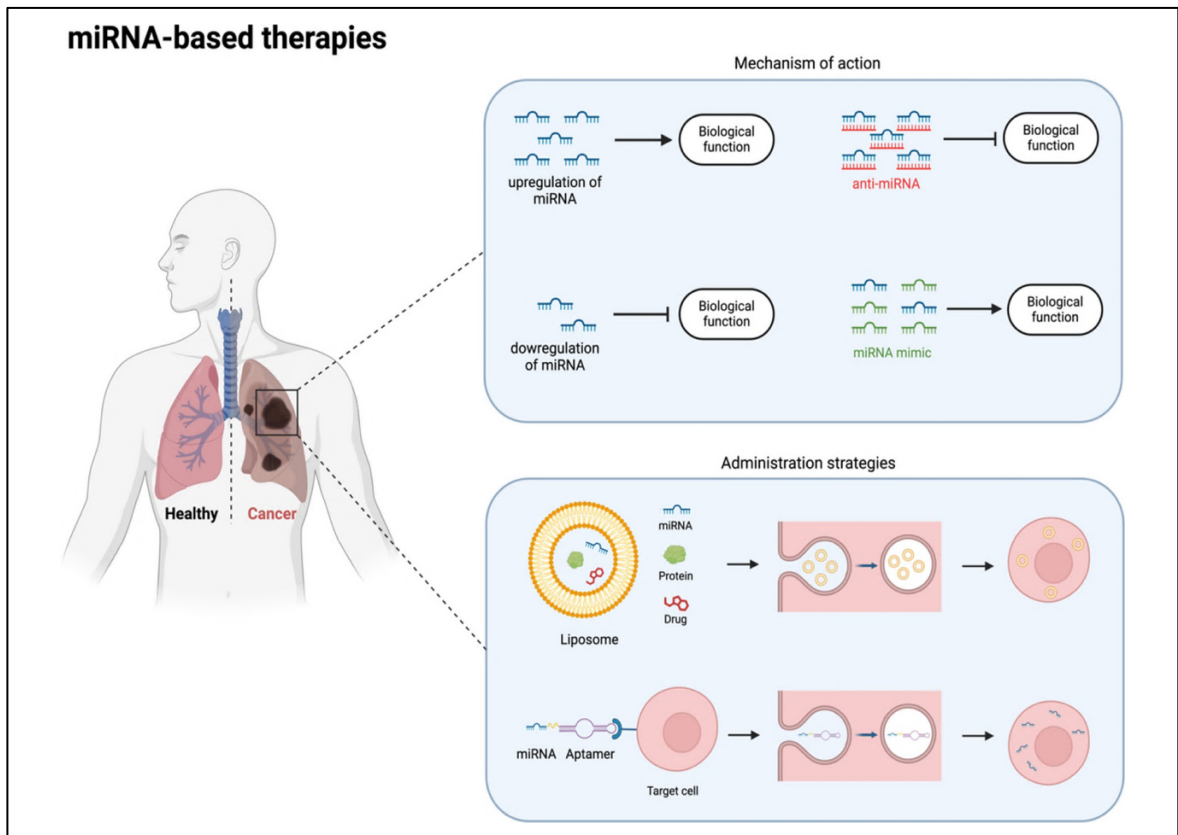


Figura 4. **Meccanismi di azione e vie di somministrazione per le terapie a base di microRNA.** Vengono rappresentate strategie di somministrazione come anti-miRNA, miRNA “mimics” e miRNA coniugati a liposomi e aptameri. Gli anti-miRNA inibiscono i miRNA endogeni, mentre i “mimics” ripristinano la funzione dei miRNA soppressori tumorali. I liposomi facilitano la somministrazione e i miRNA coniugati ad aptameri offrono un nuovo metodo ad alta efficienza e specificità. (Carrà et al., 2024)

1.3 MiRNA 214 (miR-214)

Il miR-214 umano è localizzato nella regione del cromosoma 1q23.3, più precisamente nell'introne 14 all'interno del gene della Dinamina-3 (DNM3). In questo contesto genomico troviamo anche un lungo RNA non codificante antisense che prende il nome di DNM3os che presenta una lunghezza di 8kb. Questo trascritto contiene anche le sequenze che codificano per il miR-214 e il miR-199a-2, ovvero due miRNA che si trovano in “cluster” e che sono separati da sole 6kb. Un altro piccolo RNA non codificante è presente in questa regione ed è il miR-3120 che si trova sul filamento opposto a quello dei due miRNA citati precedentemente (Figura 5) (Penna et al., 2015).

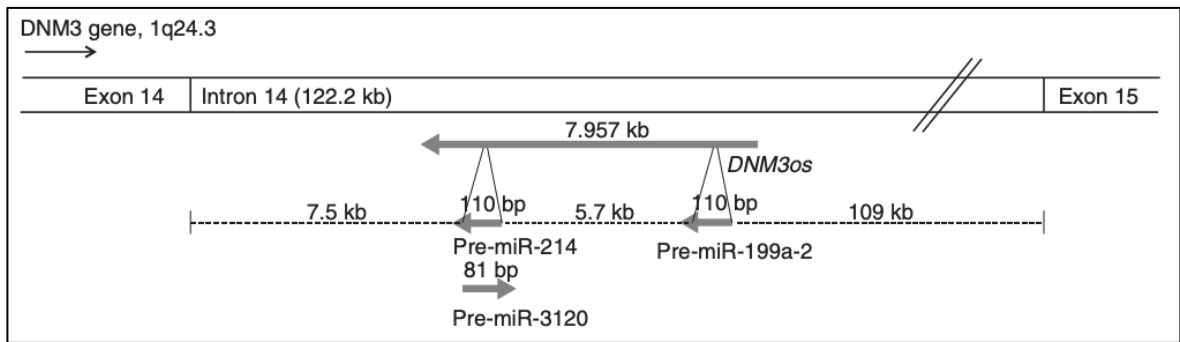


Figura 5. **Locus del miR-214 umano.** miR-214 e miR-199a-2 sono distanti 6 kb, situati all'interno del precursore del lungo RNA non codificante DNMT3os (7,9 kb), nell' introne 14 del gene della Dynamina-3 (DNMT3) (1q24.3). miR-3120 si sovrappone al locus del miR-214 ma sul filamento complementare (Penna et al., 2015).

1.3.1 Il ruolo del miR-214 nei tumori

Il ruolo del miR-214 nei tumori è contrastante; infatti, a seconda del tipo di tumore considerato, la sua espressione può essere aumentata o diminuita (Karimi et al., 2023), questo suggerisce quindi che il contesto cellulare è fondamentale per l'espressione di questo miRNA.

Il miR-214 è coinvolto nello sviluppo e nella progressione del carcinoma squamocellulare (SCC) e del melanoma. È molto spesso deregolato in questi tipi di neoplasie e in particolare nel melanoma, questa alterazione della sua espressione è particolarmente evidente. I melanociti normalmente esprimono bassi livelli del miR-214, l'espressione aumenta nei nevi, che rappresentano un'anormale, ma benigna proliferazione dei melanociti e nei melanoma *in situ* non invasivo; mentre alti livelli del miR-214 sono stati riscontrati nel melanoma primario cutaneo (Penna et al., 2011). È stato inoltre dimostrato che il miR-214 promuove l'aggressività delle cellule di melanoma mediante la regolazione di fattori di trascrizione come TFAP2C (fattore di trascrizione AP-2 gamma), molecole di adesione ITGA3 (Integrine alpha 3) e un altro piccolo RNA non codificante anti metastatico, il miR-148b (Penna et al., 2011; Penna et al., 2013). Alti livelli del miR-214 sono inoltre associati a una prognosi infausta e ad un elevato rischio di metastasi nel melanoma oculare (Worley et al., 2008). Nonostante il miR-214 sia fortemente espresso nei cheratinociti epidermici e nei follicoli piliferi e giochi un ruolo importante nella morfogenesi cutanea (Ahmed et al., 2014), i risultati riguardo al suo ruolo nel carcinoma squamoso cutaneo (SCC) e nel carcinoma basocellulare sono contrastanti. Infatti, il miR-214 risulta sovraregolato nel carcinoma squamoso orale e della lingua (Scapoli et al., 2010; Yu et al., 2010), mentre è significativamente sottoregolato nel carcinoma squamoso esofageo e

cutaneo, contribuendo alla proliferazione anomala dei cheratinociti (Huang et al., 2012; Yamane et al., 2013).

Oltre ai tumori di origine cutanea il miR-214 è sovraespresso nei tumori dei seguenti tessuti: pancreas (Volinia et al., 2006) (Zhang et al., 2010), prostata (Volinia et al., 2006) stomaco (Ueda et al., 2010; Yang et al., 2013) naso-faringe (Deng et al., 2013; Zhang et al., 2014) e polmoni (Yanaihara et al., 2006). Una sua elevata espressione è stata anche osservata nell'OS (Z. Wang et al., 2014; Xu and Wang, 2014) e nella variante leucemica del linfoma cutaneo a cellule T, nota come sindrome di Sézary (Narducci et al., 2011). L'elevata espressione del miR-214 è stata associata a una prognosi sfavorevole in termini di sopravvivenza globale, stadiazione clinica, invasività, metastasi e scarsa risposta alla terapia. Una riduzione dell'espressione di miR-214 invece è stata osservata nei carcinomi epatocellulari (Duan et al., 2012; Shih et al., 2012), della cervice uterina (Yang et al., 2009), corticosurrenali (Tömböl et al., 2009) e vescicali (Ratert et al., 2013), del colon-retto (Chen et al., 2014). Inoltre, è stata documentata una sua sottoespressione nel colangiocarcinoma (B. Li et al., 2012), nei mielomi multipli (Gutiérrez et al., 2010), nei gliomi (Wang et al., 2014) e nell'adenocarcinoma polmonare con metastasi cerebrali (C. Zhao et al., 2013). In tutte queste neoplasie, la riduzione del miR-214 è spesso associata a una maggiore malignità, metastatizzazione e/o a una scarsa sopravvivenza/recidiva (Chen et al., 2014; Ratert et al., 2013).

Il comportamento del miR-214 nei tumori del seno e dell'ovaio è più complesso, probabilmente a causa dell'eterogeneità tumorale e della componente ormonale. Il *locus* del miR-214 è frequentemente amplificato in questi tumori, come mostrato dall'analisi di ibridazione genomica comparativa (CGH) (Zhang et al., 2006); tuttavia, è stata rilevata una delezione nel 24% di un piccolo gruppo di casi di cancro al seno (Derfoul et al., 2011). Nelle grandi coorti di campioni di tumore al seno, il miR-214 è meno espresso rispetto ai tessuti normali (Dvinge et al., 2013), mentre una aumentata espressione è stata osservata nei sottotipi luminale A, ER-, PR- e HER2+ di cancro al seno (Blenkiron et al., 2007; Sempere et al., 2007). Analogamente, il miR-214 è altamente espresso nei tumori ovarici ed è significativamente associato a stadi tumorali avanzati/metastatici e a una minore sopravvivenza libera da progressione, nonché a recidive post-chirurgiche/chemioterapiche (Marchini et al., 2011; Yang et al., 2008). Tuttavia, da alcuni autori è anche stata osservata una riduzione della sua espressione in neoplasie ovariche rispetto ai tessuti normali e nei versamenti derivati dal carcinoma ovarico rispetto ai tumori primari (Iorio et al., 2007;

Vaksman et al., 2011). Un riassunto dei principali ruoli del miR-214 nei diversi tumori è presentato nella Tabella 1.

Tabella 1. **Alterazioni del miR-214 nei differenti tipi di tumore** (Penna et al., 2015)

Tumor	miR-214 expression in tumor vs. normal tissue	miR-214 correlation with metastasis or poor prognosis	Validated miR-214 targets	References
Melanoma	Up Down	Yes Yes	TFAP2, ITGA3	Penna <i>et al.</i> , 2011 Worley <i>et al.</i> , 2008 Segura <i>et al.</i> , 2010
Pancreas	Up	—	ING4	Zhang <i>et al.</i> , 2010 Volinia <i>et al.</i> , 2006
Stomach	Up	Yes	PTEN	Volinia <i>et al.</i> , 2006 Ueda <i>et al.</i> , 2010 Yang <i>et al.</i> , 2013
Prostate	Up	—	—	Volinia <i>et al.</i> , 2006
Nasopharygeal	Up	—	LTF, BIM	Deng <i>et al.</i> , 2013 Zhang <i>et al.</i> , 2014
Oral/tongue squamous	Up	—	—	Yu <i>et al.</i> , 2010 Scapoli <i>et al.</i> , 2010
Osteosarcoma	Up	Yes	LZTS1	Wang <i>et al.</i> , 2014c Xu and Wang, 2014
T-cell lymphoma	Up	Yes	—	Narducci <i>et al.</i> , 2011
Lung	Up	—	—	Yanaiharu <i>et al.</i> , 2006
Hepatocellular	Down	Yes	HDGF, XBP1, EZH2, FGFR1, β -catenin	Shih <i>et al.</i> , 2012 Xia <i>et al.</i> , 2012 Wang <i>et al.</i> , 2013b
Uterus cervix	Down	Yes	PLXNB1, GALNT7, MEK3, JNK1	Yang <i>et al.</i> , 2009 Qiang <i>et al.</i> , 2011
Adrenocortical	Down	—	—	Tombol <i>et al.</i> , 2009
Esophageal	Down	—	—	Huang <i>et al.</i> , 2012
Cutaneous squamous	Down	—	ERK1	Yamane <i>et al.</i> , 2013
Myeloma	Down	—	ASF1B, GANKYRIN	Gutierrez <i>et al.</i> , 2010
Bladder	Down	Yes	—	Ratert <i>et al.</i> , 2013
Glioma	Down	Yes	UBC9	Wang <i>et al.</i> , 2014b
Colorectal	Down	Yes	FGFR1	Chen <i>et al.</i> , 2014
Rhabdomyosarcoma	Down	—	NRAS	Huang <i>et al.</i> , 2014
Ovary	Up Down	Yes Yes	PTEN, p53	Yang <i>et al.</i> , 2008 Marchini <i>et al.</i> , 2011 lorio <i>et al.</i> , 2007
Breast	Up Down	Yes Yes	EZH2	Derfoul <i>et al.</i> , 2011 Schwarzenbach <i>et al.</i> , 2012 Blenkiron <i>et al.</i> , 2007

1.3.2 Il ruolo del miR-214 nell'osteosarcoma

Come è stato descritto in precedenza, il miR-214 è coinvolto nei processi patologici dell'OS. In particolare, in questo tipo di tumore è stato osservato come una sua aumentata espressione possa aumentare la progressione (Zhu et al., 2017), la proliferazione cellulare, l'invasione e la migrazione (Cai et al., 2018; Xu and Wang, 2014). Zhu e collaboratori hanno esaminato come un aumento dell'espressione del miR-214 causi un'attivazione eccessiva del segnale cellulare Wnt (proteine wingless Int-1)/ β -catenina coinvolto nella proliferazione in cellule di OS (Zhu et al., 2017). Esaminando lo studio condotto da Cai e colleghi è possibile osservare come una sovraregolazione del miR-214 inibisca l'espressione di

CADM1 (cell adhesion molecule 1) e causi un aumento di invasione e migrazione (Cai et al., 2018).

Alti livelli di questo miRNA sono inoltre correlati con una prognosi infausta specialmente nell'OS pediatrico (Z. Wang et al., 2014). Il miR-214 svolge un ruolo chiave nella risposta alla terapia, infatti livelli alti di espressione sono associati ad un aumento della resistenza nei confronti della radioterapia (Li et al., 2019). Lo studio guidato da Li ha rivelato come alti livelli di espressione del miR-214 nell'OS inibiscano PHLDA2 (Pleckstrin homology-like domain family A member 2). Questa bassa attività da parte di PHLDA2 sembrerebbe giocare un ruolo fondamentale nella radioresistenza causata dall'attivazione della via di segnalazione Akt. Il lavoro di Song e colleghi invece ha messo in luce come abbassando i livelli di miR-214 a valori fisiologici, la sensibilità alla chemioterapia con cisplatino aumenti sensibilmente (Song et al., 2017).

2. OBIETTIVO DELLO STUDIO

Dati del nostro laboratorio e di altri ricercatori hanno mostrato che l'elevata espressione del miR-214 nelle cellule di OS promuove la progressione del tumore. In particolare, il miR-214 promuove la proliferazione, la migrazione e l'invasione delle cellule di OS. Inoltre, è stata osservata una correlazione tra i livelli di espressione del miR-214 e la resistenza alla chemio e radioterapia. Lo scopo di questo lavoro di tesi è valutare il possibile vantaggio terapeutico ottenuto dalla combinazione dell'inibizione del miR-214 associata ad un farmaco standard per il trattamento dell'OS, il metotrexato. Per questo scopo verranno esaminati gli effetti su proliferazione e migrazione di cellule di OS trattate con un inibitore del miR-214, con metotrexato o con una combinazione di entrambi.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Colture cellulari

Sono state utilizzate le seguenti linee cellulari provenienti da ATCC (American Type Culture Collection):

- HEK293T (cellule tumorali embrionali di rene umano)
- MG63 (cellule di osteosarcoma isolate da un paziente maschio di 14 anni)
- U2OS (cellule di osteosarcoma tibiale isolate da paziente femmina di 15 anni)
- A673 (cellule di muscolo isolate da una paziente femmina di 15 anni affetta da sarcoma di Ewing)
- SK EN (cellule isolate da un paziente maschio di 18 anni affetto da sarcoma di Ewing)

Le cellule sono state mantenute in coltura in condizioni standard (37°C al 5% di CO₂) in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) contenente il 10 mM Glutamax e 4,5 g/l di glucosio (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), addizionato con il 10% di siero bovino fetale inattivato con il calore (FBS), 1 mM di piruvato di sodio, 25 mM di HEPES pH 7,4 e 100 µg/mL di gentamicina (tutto della Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

3.2 Trasfezione delle cellule.

Per ottenere una delezione (“knock-out”) del gene Hsa-miR-214 umano si è adottato un approccio CRISPR-Cas9. Le cellule HEK293T sono state trasfettate con il metodo del calcio fosfato. 1500000 cellule HEK293T sono state trasfettate in piastra da 10 cm di diametro rispettivamente con: 10 ng di un vettore vuoto di controllo esprime la proteina fluorescente verde pCMV-GFP (green fluorescent protein) e 10 ng di due vettori contenenti rispettivamente le due guide PX459 sgRNA 2 e PX459 sgRNA 3 clonati e gentilmente forniti dalla Dr.ssa Balzac, Laboratorio Prof.ssa Emilia Turco (Molecular Biotechnology Center, UniTo, Italy) (Figura 6) . Le guide PX459 sgRNA 2 e PX459 sgRNA 3 sono state disegnate utilizzando software:

- UCSC Genome Browser
- Integrated DNA Technologies
- CRISPOR

Si è deciso di utilizzare in parallelo entrambe le sgRNA, in quanto sono risultate le più specifiche tra tutte le guide proposte dai diversi software. Le guide sono state

successivamente clonate all'interno di un vettore puro PX459 (Figura 6) contenente al suo interno anche una sequenza per Cas9, una resistenza all'ampicillina (AmpR) e una resistenza alla puromicina (PuroR).

Una volta avuta la conferma della effettiva trasfezione grazie alla verifica dell'espressione della proteina GFP al microscopio a fluorescenza EVOS FLoid Imaging System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), le cellule sono state selezionate con un terreno contenente puromicina (1µg/ml). Grazie alla resistenza presente nei vettori utilizzati sono state selezionate le cellule esprimenti in maniera stabile i plasmidi contenenti le guide.

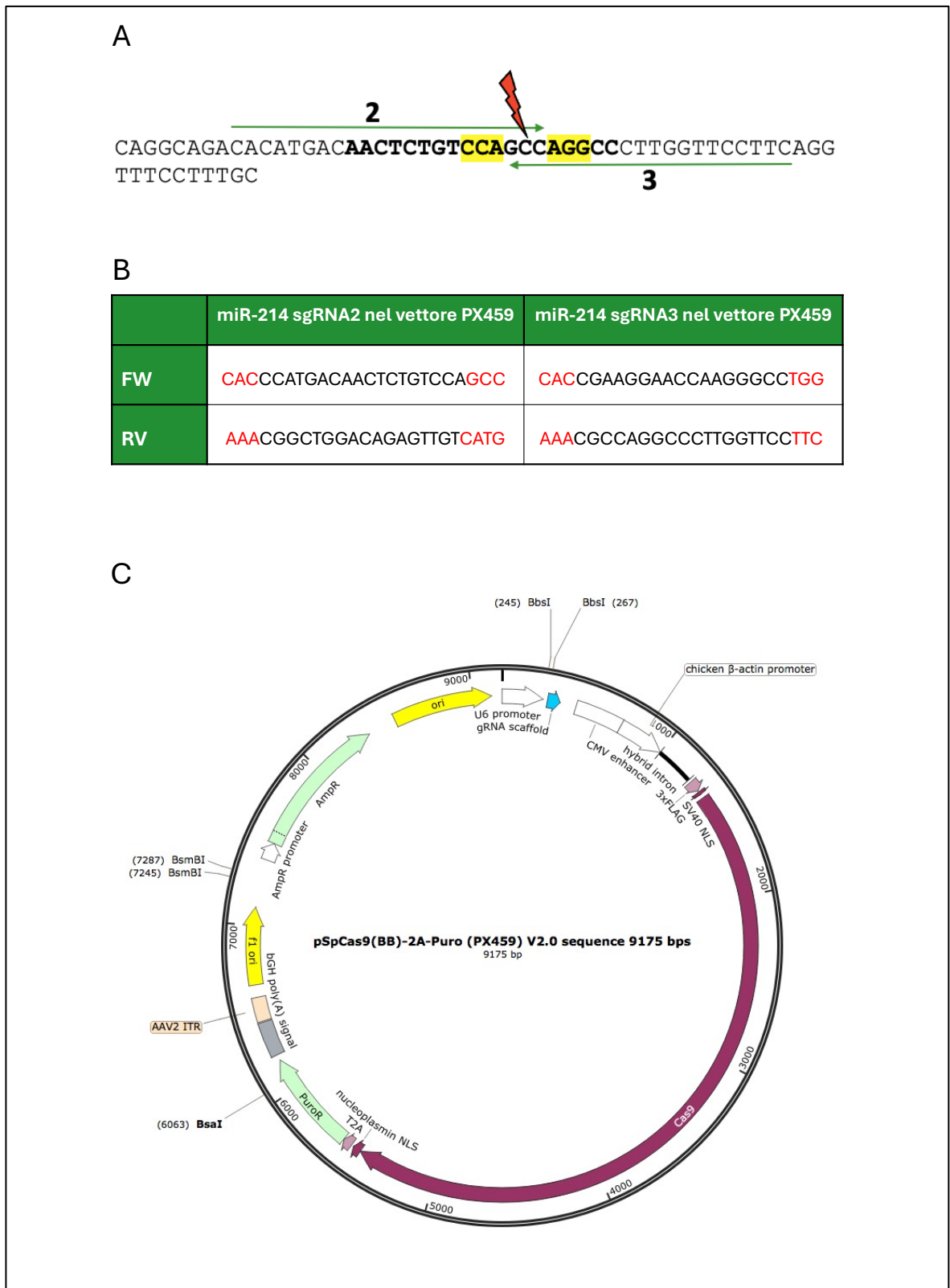


Figura 6. Sequenze delle due guide scelte per la delezione (“knock-out”) di miR-214 sgRNA 2 e sgRNA 3. **A** Sequenza del Hsa-miR-214 e appaiamento dei due RNA guida sgRNA 2 e sgRNA 3. **B** Sequenze clonate in PX459 per entrambi i sgRNA. **C** vettore PX459 in cui sono state clonate entrambe le sequenze sgRNA.

Per ottenere la riduzione transiente dell'espressione del miR-214 ("knock -down"), le cellule di OS MG63 sono state trasfettate con un inibitore di controllo (AM17010) costituito da una sequenza casuale non funzionale ("scramble") (anti-ctrl), un inibitore del miR-214 (AM12124) costituito da una sequenza in grado di appaiarsi alla sequenza del miR-214 e quindi di bloccarne la funzione (anti-miR-214) (tutti ottenuti da Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Per indurre invece la sovraespressione transiente del miR-214 sono stati utilizzati dei "mimic" non funzionali di controllo (pre-ctrl, AM17110), un "mimic" per il miR-214 (pre-miR-214, AM17100) ed infine per indurre una sovraespressione stabile per il miR-214 sono stati utilizzati un pLemiR-214 e il suo controllo pLemiR-empty come descritto in (Penna et al., 2011). Per i saggi di proliferazione 4000 cellule MG63 sono state piastrate in ciascun pozzetto di una piastra per colture cellulari da 96 pozzetti o alternativamente 50000 in un pozzetto di una piastra da 24 pozzetti e trasfettate con Lipofectamine™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) utilizzando il metodo della trasfezione inversa ("reverse transfection") per 16 ore (O/N "over night"). Sono stati trasfettati anti-ctrl/ anti-miR-214 ad una concentrazione finale di 75nM e sono stati utilizzati (5 µg/ml) di Lipofectamine™ 2000 per ogni pozzetto in terreno privo di gentamicina secondo le indicazioni del protocollo fornite dal produttore. Il mattino seguente la miscela di trasfezione è stata rimossa. Per il saggio di motilità cellulare sono state piastrate 250000 in ciascun pozzetto di una piastra da 6 pozzetti e trasfettate con Lipofectamine™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) utilizzando il metodo della trasfezione inversa ("reverse transfection") O/N e le condizioni indicate precedentemente.

3.3 Estrazione dell'RNA e qRT-PCR

L'RNA totale è stato isolato grazie all'utilizzo del reagente TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) secondo le istruzioni del produttore. Brevemente, sono stati utilizzati 250 µl di reagente TRIzol per ciascun pozzetto di una piastra da 24 pozzetti. È stato aggiunto il cloroformio e si è proceduto alla centrifugazione (12600 rpm per 30 minuti a 4°C). Il surnatante ottenuto, contenente l'RNA è stato trasferito in una nuova provetta ed è stato aggiunto l'isopropanolo per precipitare l'RNA (10 minuti a temperatura ambiente). Successivamente, il campione è stato sottoposto a centrifugazione (12600 rpm per 30 minuti a 4°C), il surnatante è stato eliminato e l'RNA presente sul fondo della provetta (*pellet*) è stato lavato con etanolo 70% per due volte seguite da centrifugazione (7600 rpm per 15

minuti a 4°C). L'RNA è stato lasciato asciugare a temperatura ambiente e successivamente risospeso in 20 µl di acqua priva di nucleasi e conservato a -80°C.

Per valutare l'espressione del miR-214 è stata utilizzata la tecnica della Real Time quantitativa preceduta da retrotrascrizione (qRT-PCR) utilizzando "primers" specifici per il miR-214 TaqMan MicroRNA Expression Assays (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 10 ng di RNA totale per ciascun campione sono stati retrotrascritti usando microRNA reverse transcription (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) secondo con le istruzioni del produttore. La qRT-PCR è stata eseguita impiegando il Taqman microRNA assay Hsa-miR-214 (ID 002306) e la macchina per la PCR quantitativa QuantStudio 6 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Il piccolo RNA nucleare RNU44 è stato utilizzato per la normalizzazione Taqman microRNA assay U44 snRNA (ID001094). È stata effettuata una analisi di espressione relativa comparando i delta CT (valore soglia del numero di cicli) dei campioni e utilizzando la seguente formula: $2^{-\Delta\Delta CT}$ in accordo con Bookout e Mangelsdorf (Bookout and Mangelsdorf, 2003).

3.4 Proliferazione e vitalità cellulare

Per individuare l'IC₅₀ (IC= concentrazione inibente) del MTX si è deciso di seminare 2500 cellule di MG63 per ciascun pozzetto in una piastra da 96 pozzetti e trattarle con dosi crescenti di MTX (0,05 µM; 0,1 µM; 0,5 µM; 1 µM e 10 µM) in terreno normale. La proliferazione è stata valutata in un apposito strumento IncuCyte® Live-Cell Analysis System (Sartorius) in grado di scattare foto a tempi definiti e per un determinato lasso di tempo. Per questo esperimento sono state scattate 3 foto ogni 6 ore per 72 ore per ciascun pozzetto. È stato quindi possibile seguire l'andamento della proliferazione cellulare e i dati acquisiti sono stati elaborati utilizzando il "software" IncuCyte® Zoom. La quantificazione di questo software si basa sul principio della confluenza cellulare presente all'interno della piastra in ciascun tempo sperimentale. Per calcolare la confluenza è necessario creare al momento dell'analisi una maschera, ovvero un sistema che permette al programma di individuare la posizione delle cellule e di discriminare l'area della cellula dal fondo della piastra. Attraverso un algoritmo e l'intelligenza artificiale del "software" è possibile stimare la % di confluenza dell'immagine scattata in quel momento. Unendo tutti gli intervalli di tempo per ogni condizione presente all'interno della piastra, è possibile creare dei grafici che rappresentino l'andamento della crescita cellulare.

Per valutare l'effetto dell'inibizione del miR-214 in combinazione con il MTX, le cellule sono state trasfettate con un anti-ctrl e un anti-miR-214 come descritto sopra. Dopo 16 ore dalla trasfezione, le cellule sono state lavate 3 volte con un tampone fosfato salino (PBS), il terreno di coltura è stato sostituito con un terreno privo di FBS e le cellule incubate per 16 ore per permetterne la sincronizzazione. Le cellule trasfettate sono quindi state trattate con terreno normale o con terreno normale addizionato con il metotrexato (MTX) 0,5 μ M.

In parallelo, sono state eseguite delle analisi di vitalità utilizzando il reagente CCK-8 (Elabscience®). Le cellule MG63 sono state trasfettate come descritto sopra. Sono state preparate due piastre da 96 pozzetti con le stesse condizioni descritte in precedenza. Al tempo 0 (t=0) ore e poi dopo 72 ore (t=72) sono stati aggiunti 10 μ l di reagente per ogni pozzetto da analizzare, compresi 3 pozzetti considerati come controllo o bianco ("blank") contenenti solamente il terreno. Dopo 3 ore di incubazione l'assorbanza a 450 nm è stata valutata utilizzando lo spettrofotometro Victor X (PerkinElmer®). Il valore di assorbanza o densità ottica (OD, optical density) indicativo dell'indice di vitalità è stata ottenuta utilizzando la seguente formula:
$$\frac{\text{OD t=72 ore} - \text{OD t=72 ore bianco}}{\text{OD t=0 ore} - \text{OD t=0 ore bianco}}$$
.

3.5 Motilità cellulare mediante valutazione della abilità di riparare la ferita o "wound healing"

Le cellule sono state trasfettate con un anti-ctrl e un anti-miR-214 come indicato in precedenza e dopo circa 8 ore dal cambio di terreno, le cellule sono state staccate e riseminate in una piastra da 48 pozzetti (6 pozzetti per ogni condizione) per l'esperimento di riparazione della ferita o "wound healing" e in una piastra da 24 pozzetti (1 pozzetto per condizione) per estrarre l'RNA e valutare l'avvenuta trasfezione. Dopo circa 16 ore, il terreno è stato sostituito con terreno privo di FBS per sincronizzare le cellule, bloccare la proliferazione e stimolare la motilità. Dopo 8 ore, è stata praticata la ferita a forma di croce per ogni pozzetto con un puntale sterile da 200 μ l di una micropipetta. Ogni pozzetto è stato lavato 3 volte con il PBS per rimuovere eventuali detriti dovuti all'incisione con il puntale, successivamente è stato aggiunto alle cellule trasfettate con anti-ctrl e anti-miR-214 il terreno normale contenente FBS con o senza MTX 0,5 μ M. Il movimento bidimensionale è stato misurato calcolando la distanza della ferita al t=0, t=16 e t=24 ore. Sono state scattate 4 immagini (una per ogni braccio della croce) per ogni pozzetto ad ogni tempistica analizzata utilizzando il microscopio Leica DMi1 (Leica microsystems) dotato di camera Leica MC120 HD (Leica

microsystems). Le immagini sono state quantificate utilizzando il programma ImageJ Software (<https://imagej.net/ij/>). I movimenti bidimensionali sono stati calcolati utilizzando la formula per il calcolo della velocità di migrazione descritta in Grada et al., 2017.

3.6 Migrazione cellulare

Per misurare la migrazione cellulare, sono state seminate 75000 cellule U2OS e MG63 in terreni privi di siero nelle camere superiori degli inserti di coltura cellulare (Transwell) con membrana di dimensione dei pori di 8,0 μm (formato da 24 pozzetti, Becton Dickinson, NJ). Le camere inferiori sono state riempite con terreni di crescita normali. Dopo 18 ore, le cellule migranti presenti sul lato inferiore della membrana sono state fissate in gluteraldeide al 2,5%, colorate con cristalvioletto allo 0,1% e fotografate utilizzando un microscopio Olympus IX70.

3.7 Analisi di sopravvivenza

Le analisi di associazione di sopravvivenza sono state eseguite utilizzando il software statistico SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) e la suite di strumenti “software” Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>). Il metodo delle caratteristiche operative del ricevitore (ROC) è stato utilizzato per classificare i campioni in base all'espressione del miRNA-214. Le curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier sono state utilizzate per stimare i modelli tempo-evento. Le differenze di rischio tra i due gruppi sono state valutate utilizzando il test dei ranghi logaritmici di Mantel-Haenszel. L'associazione di sopravvivenza in pazienti con alti livelli di miR-214 è stata valutata in GSE39058 su una numerosità campionaria pari a $n=47$ (Kelly et al., 2013). Si ringrazia la Dott.ssa Aurora Savino per aver condotto l'analisi bioinformatica.

3.8 Predizione dei farmaci

Per identificare una serie di farmaci la cui efficacia possa beneficiare di una inibizione dell'espressione del miR-214, è stata condotta una analisi bioinformatica sui dati depositati in CCLE, Cancer Cell Line Encyclopedia, (Ghandi et al., 2019) e GDSC, Genomics of Drug Sensitivity in Cancer, (Iorio et al., 2016) a partire da un pannello di cellule di OS.

3.9 Analisi statistica

I risultati vengono visualizzati come media di tre replicati biologici \pm deviazione standard (SD) o \pm errore standard della media (SEM), come indicato. Il t-test è stato

utilizzato per analisi parametriche tra due gruppi. Quando sono stati eseguiti confronti per più di due gruppi è stato scelto il test ANOVA per le analisi parametriche. * = $P \leq 0,05$; ** = $P \leq 0,01$; *** = $P \leq 0,001$; **** = $P \leq 0,0001$ sono stati considerati statisticamente significativi.

4. RISULTATI

4.1 Il miR-214 promuove la progressione dell'OS ed è implicato nella risposta alla terapia

Come descritto nell'introduzione è stato dimostrato che il miR-214 promuove la crescita, la migrazione e l'invasione delle cellule di OS e risulta sovraespresso in campioni di pazienti di OS caratterizzati da cattiva prognosi (Cai et al., 2018; Xu and Wang, 2014). Abbiamo quindi verificato in una serie di dati di espressione di miRNA derivati da campioni di pazienti affetti da OS (n=47) disponibili pubblicamente (GSE39058, Kelly et al., 2013) se i livelli di miR-214 correlassero con l'intervallo libero da malattia (DFS). Come mostrato in Figura 7, è stato osservato un ridotto intervallo da malattia ($p=0.0033$) in pazienti che esprimono alti livelli del miR-214.

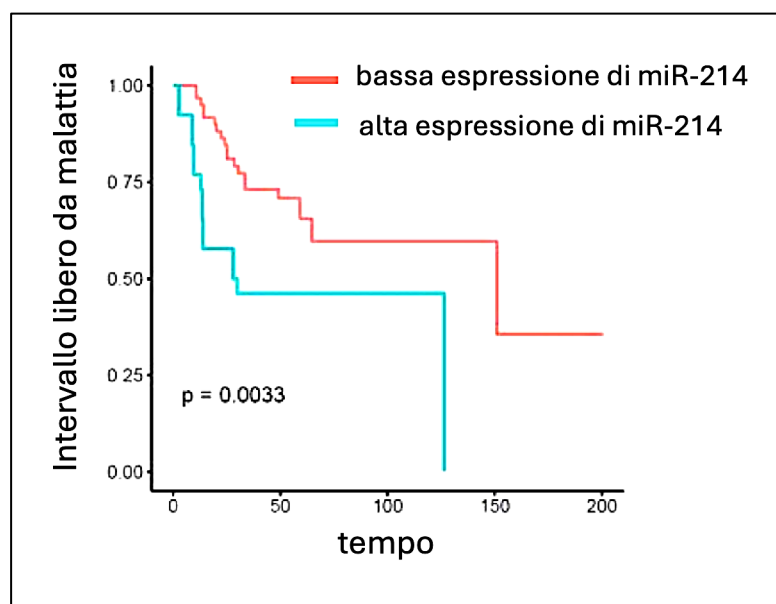


Figura 7. Sopravvivenza dei pazienti affetti da OS in relazione ai livelli di espressione del miR-214. Analisi di Kaplan Meier sulla serie di dati GSE39058(Kelly et al., 2013), contenente i dati di espressione per 47 campioni di OS $p=0,003$ (grazie alla Dott.ssa Aurora Savino).

Successivamente, sono stati valutati i livelli di espressione del miR-214 in un pannello di cellule di OS (MG63 e U2OS) e di sarcoma di Ewing (A673 e SK EN). Come

mostrato in Figura 8, le cellule analizzate hanno mostrato livelli variabili di miR-214, con le cellule U2OS che presentano i livelli più elevati di espressione.

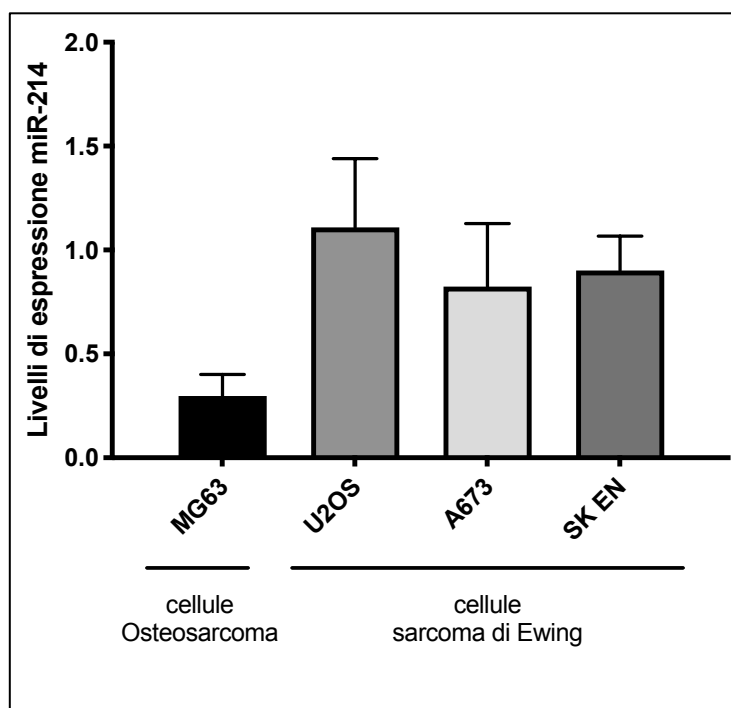


Figura 8. **Livelli di espressione del miR-214 in linee cellulari di OS e di sarcoma di Ewing.** Analisi dei livelli di espressione del miR-214 in un pannello di cellule di OS (MG63 e U2OS) e di sarcoma di Ewing (A673, SK EN) mediante qRT-PCR. I risultati sono mostrati come “fold change” (media \pm SD dei triplicati) relativi alla mediana di espressione normalizzati su RNU44. Sono stati condotti due esperimenti indipendenti e ne è mostrato uno rappresentativo. SD= deviazione standard

Per verificare che il miR-214 effettivamente promuovesse i tratti metastatici delle cellule di OS, la migrazione di cellule U2OS trasfettate con un miRNA “mimic” per il miR-214 (pre-miR-214) o con un miRNA “mimic” di controllo (sequenza casuale; pre-ctrl) e di cellule MG63 sovraesprimenti stabilmente il miR-214 o trasdotte con il vettore di controllo (pLemiR-empty) è stata valutata tramite il saggio Transwell. Come mostrato in Figura 9, la sovraespressione del miR-214 aumenta la capacità delle cellule di OS di migrare.

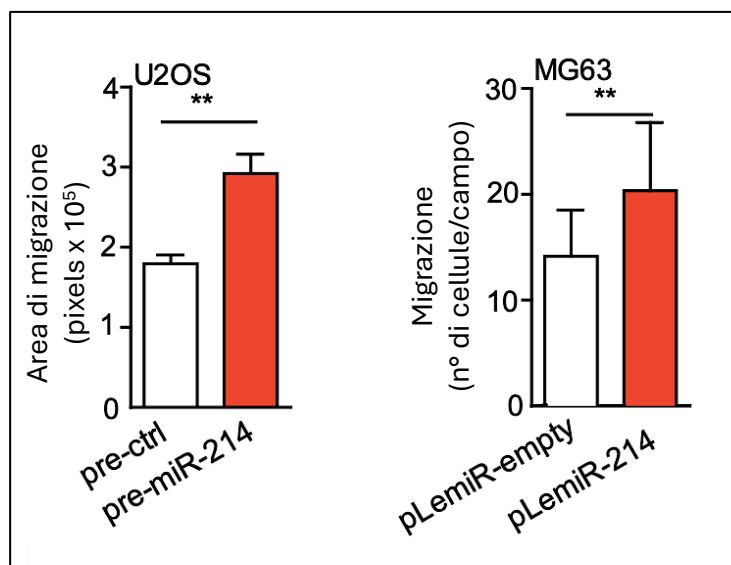


Figura 9. **Saggio di migrazione in linee cellulari di OS.** Analisi della migrazione mediante saggio “transwell” di cellule di OS trasfettate (U2OS) o con un miRNA “mimic” specifico per il miR-214 (pre-miR-214) o con un “mimic” di controllo (pre-ctrl) o trasdotte (MG63) con un vettore di controllo pLemiR-empty o con un vettore contenente la sequenza del miR-214 (pLemiR-214). I risultati sono mostrati come la media \pm SD dei triplicati dell’area occupata dalle cellule migrate dopo 18 h. Sono stati condotti due esperimenti indipendenti e ne è mostrato uno rappresentativo. SD= deviazione standard. **P<0,01

Poiché i dati della letteratura mostrano un coinvolgimento di miR-214 nella radiosensibilità e nella chemiosensibilità delle cellule di OS sia *in vitro* che *in vivo* (Song et al., 2017), è stata effettuata una analisi bioinformatica utilizzando i dati presenti nel CCLE (Cancer Cell Line Encyclopedia) (Ghandi et al., 2019) e nel GDSC (Genomics of Drug Sensitivity in Cancer) (Iorio et al., 2016) per identificare dei trattamenti che possano beneficiare di una riduzione dell’espressione del miR-214 per aumentare la loro efficacia. Le diverse linee cellulari di OS (HOS, U2OS, Saos-2, MG-63, G-292-Clone-A141B1) sono state suddivise in due gruppi in base ai livelli di espressione di miR-214. Successivamente sono state identificate 11 molecole che mostrano un aumento della concentrazione inibente 50 (IC50), ovvero la concentrazione necessaria per inibire la crescita cellulare del 50% nelle linee con livelli più alti di miR-214 (Tabella 2), tra cui spicca il metotrexato (MTX), uno dei trattamenti di elezione utilizzato nella clinica per l’OS. Per questi motivi, abbiamo deciso di valutare l’efficacia del MTX in combinazione all’inibizione del miR-214 nel ridurre l’aggressività delle cellule di OS.

Tabella 2. Elenco delle 11 molecole per il quale un'alta espressione del miR-214 nelle cellule di OS è correlata con un'aumentata IC50. (grazie alla Dott.ssa Aurora Savino).

Composto	p-Value
Methotrexate	0,04975737
WZ3105	0,03629635
IMD-0354	0,00461399
SL0101	0,01044502
JNK Inhibitor VIII	0,01444297
Serdemetan	0,04717613
Cavpivasertib	0,01007917
5Z)-7-Oxozeaenolo	0,02371459
Piperlongumine	0,04522156
AZD6738	0,02049792
TTK_3146	0,04625319

IC= concentrazione inibente

4.2 Generazione di un modello cellulare delecto (“knock-out”) del gene Hsa-miR-214 mediante il sistema CRISPR-Cas9

Per valutare l'efficacia della combinazione del metotrexato (MTX) e dell'inibizione del miR-214 nel ridurre l'aggressività delle cellule di OS, abbiamo deciso di generare un modello di cellule di OS delecto per il gene Hsa-miR-214 “knock-out” utilizzando il sistema CRISPR-Cas9. Prima di procedere alla generazione del modello “knock-out” di OS abbiamo deciso di verificare l'efficacia della delezione nelle cellule HEK293T, note per la loro alta efficienza di trasfezione. Per ottimizzare le condizioni di trasfezione, inizialmente abbiamo trasfettato le cellule HEK293T con un vettore plasmidico (pCMV-GFP) contenente la sequenza per la proteina verde fluorescente (GFP) utilizzando il metodo del calcio fosfato. Dopo 24 ore dalla trasfezione, l'efficienza di trasfezione è stata valutata al microscopio a fluorescenza. Come è possibile osservare dalle immagini (Figura 10), le cellule trasfettate hanno mostrato una buona efficienza di trasfezione intorno all'80%.

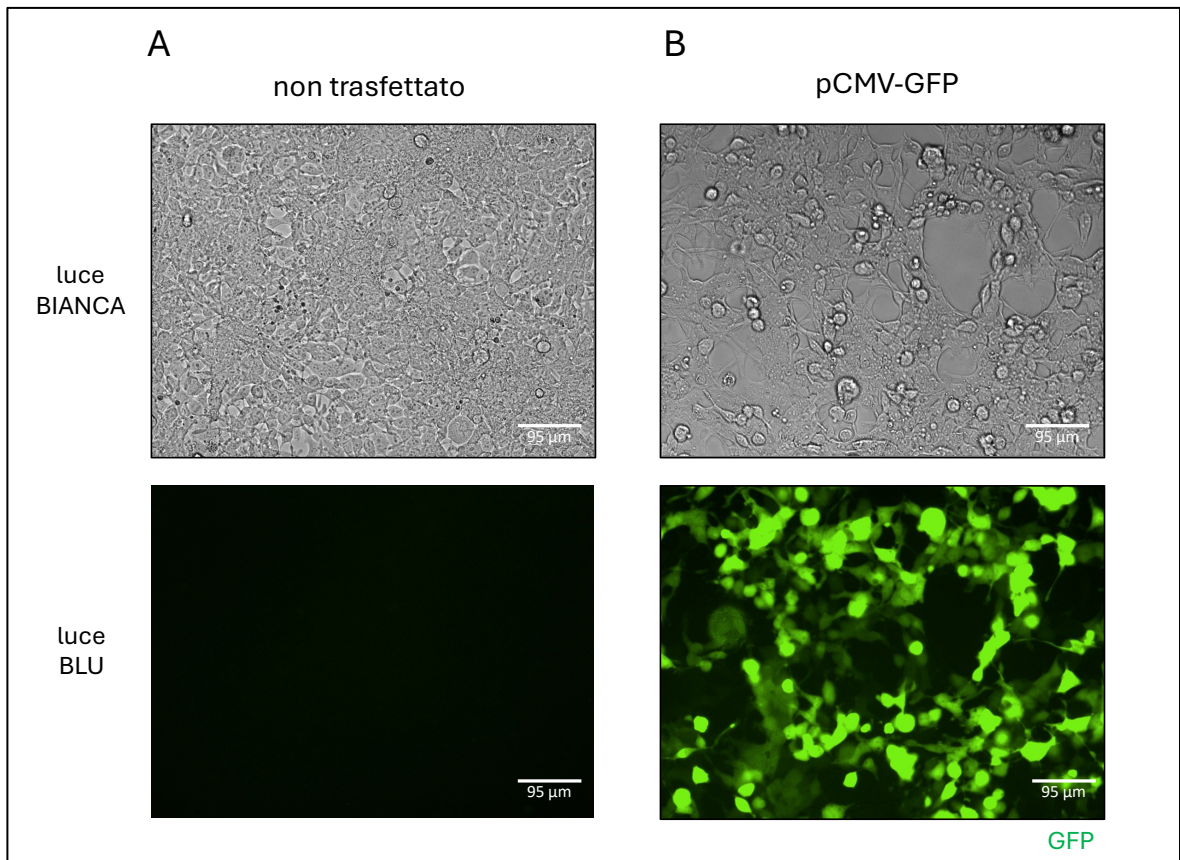


Figura 10. Verifica del livello di trasfezione in HEK293T trasfettate con il vettore pCMV-GFP. Immagini rappresentative al microscopio a fluorescenza delle cellule HEK293T di controllo non trasfettate **A** o trasfettate con un vettore pCMV-GFP **B** dopo 24 ore dalla trasfezione, acquisite sia nel campo visibile (pannelli superiori) sia in fluorescenza a 475-510 nm (pannelli inferiori).

Una volta ottimizzate le condizioni di trasfezione, abbiamo trasfettato le cellule HEK293T con il plasmide esprimente GFP (pCMV-GFP) usato come controllo e con i due plasmidi contenenti ciascuno un RNA guida (PX459 sgRNA 2 e PX459 sgRNA 3) insieme alla sequenza per Cas9. Una volta trasfettate le cellule, abbiamo controllato l'avvenuta trasfezione mediante valutazione dell'espressione della proteina GFP nelle cellule di controllo al microscopio a fluorescenza, mentre non è stato possibile effettuare questo tipo di analisi per le cellule trasfettate con PX459 sgRNA 2 e PX459 sgRNA 3 in quanto il costrutto utilizzato è privo della sequenza del gene della GFP, ma è comunque stata valutata la vitalità delle cellule dopo la trasfezione (Figura 11). Dal momento che i vettori PX459 sgRNA 2 e PX459 sgRNA 3 contengono un gene per la resistenza alla puomicina, le cellule trasfettate sono state sottoposte a selezione per 7 giorni. Dalle cellule esprimenti i plasmidi PX459 sgRNA 2, PX459 sgRNA 3 e dalle cellule di controllo (portate a confluenza paragonabile), è stato estratto l'RNA per valutare l'espressione del miR-214, dopo la delezione, mediante una PCR quantitativa Real Time preceduta da retrotrascrizione specifica per il miR-214 e per il piccolo RNA nucleare U44 usato come normalizzatore. Come è

possibile osservare dal grafico in Figura 12, le cellule che esprimono i vettori PX459 sgRNA 2 e PX459 sgRNA 3 mostrano una riduzione dell'espressione del miR-214 rispetto alle cellule di controllo, ma non è stato possibile osservare una totale assenza di espressione del miR-214 come era invece atteso in seguito alla delezione del gene mediante sistema CRISPR-Cas9.

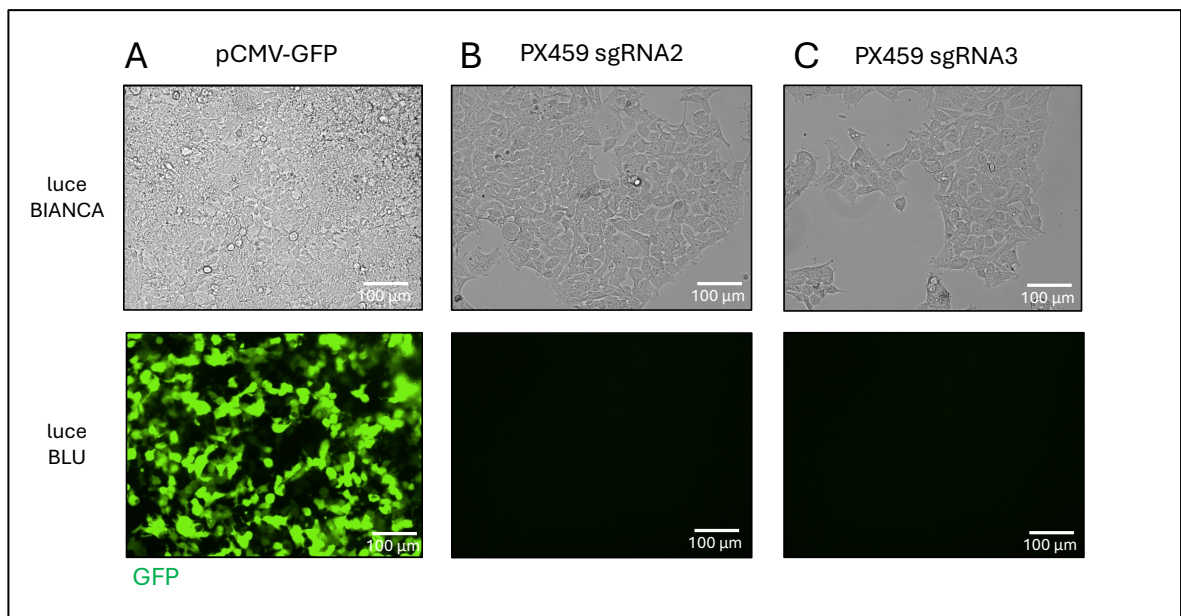


Figura 11. **Trasfezione dei costrutti per la delezione del gene Hsa-miR-214 (“knock-out”) utilizzando un approccio CRISPR-Cas9.** Immagini rappresentative al microscopio a fluorescenza delle cellule HEK293T trasfettate con un vettore pCMV-GFP **A** o con i vettori PX459 sgRNA 2 e PX459 sgRNA3 **B,C** dopo 24 ore dalla trasfezione acquisite sia nel campo visibile (pannelli superiori) sia in fluorescenza a 475-510 nm (pannelli inferiori).

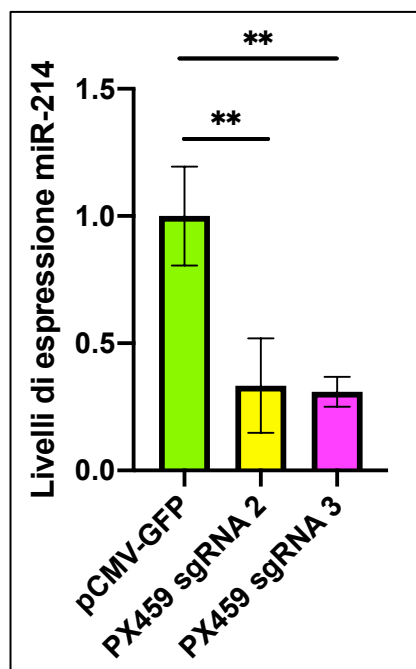


Figura 12. **Espressione del miR-214 nelle cellule HEK293T trasfettate con pCMV-GFP, PX459 sgRNA 2 e PX459 sgRNA 3.** Analisi dei livelli di espressione del miR-214 mediante qRT-PCR in cellule HEK293T trasfettate con il vettore pCMV-GFP (usate come controllo) e con i vettori PX459 sgRNA 2 e PX459 sgRNA3, rispettivamente. I risultati sono mostrati come “fold change” (media \pm SD dei triplicati) relativi alla media di espressione delle cellule di controllo (pCMV-GFP) e normalizzati su RNU44. Sono stati condotti due esperimenti indipendenti e ne è mostrato uno rappresentativo. SD= deviazione standard. **P<0,01.

4.3 L’inibizione dell’espressione del miR-214 (“knock-down”) in combinazione con il metotrexato non mostra alcun vantaggio nell’inibire la proliferazione nelle cellule di OS.

Visto l’insuccesso nel generare un modello deleto (“knock-out”) per l’espressione di miR-214 abbiamo deciso di usare un approccio alternativo per inibire l’espressione del miR-214 mediante l’utilizzo di un anti-miR-214 (“knock-down”) e combinare l’inibizione del miR-214 con il trattamento con metotrexato (MTX).

Per individuare la corretta concentrazione di MTX da utilizzare nei nostri esperimenti abbiamo analizzato lo studio di Bazavar e colleghi (Bazavar et al., 2020). In questo lavoro è stato dimostrato che l’ IC50 di MTX sulla linea MG63 è pari a 0,5 μ M (Bazavar et al., 2020). Prendendo spunto da questo lavoro, abbiamo deciso di verificare l’effetto di diverse concentrazioni di MTX sulla proliferazione delle cellule MG63. Abbiamo osservato che l’efficacia della concentrazione 0,5 μ M di MTX equivalente all’IC50 precedentemente riportato in letteratura (Bazavar et al., 2020), ha inibito la proliferazione cellulare del 50%

nel nostro modello (Figura 13). Abbiamo deciso quindi di utilizzare questa concentrazione per i successivi esperimenti.

Per valutare se l'inibizione dell'espressione di miR-214 in combinazione con il MTX potesse avere un vantaggio nell'inibire la proliferazione delle cellule di MG63 rispetto ai singoli trattamenti, le cellule MG63 sono state trasfettate transientemente con un inibitore specifico per il miR-214 (anti-miR-214) o con una sequenza di controllo (anti-ctrl). Il giorno successivo alla trasfezione le cellule sono state poste in terreno privo di siero per favorirne la sincronizzazione e successivamente trattate con terreno normale oppure terreno normale addizionato di MTX 0,5 uM.

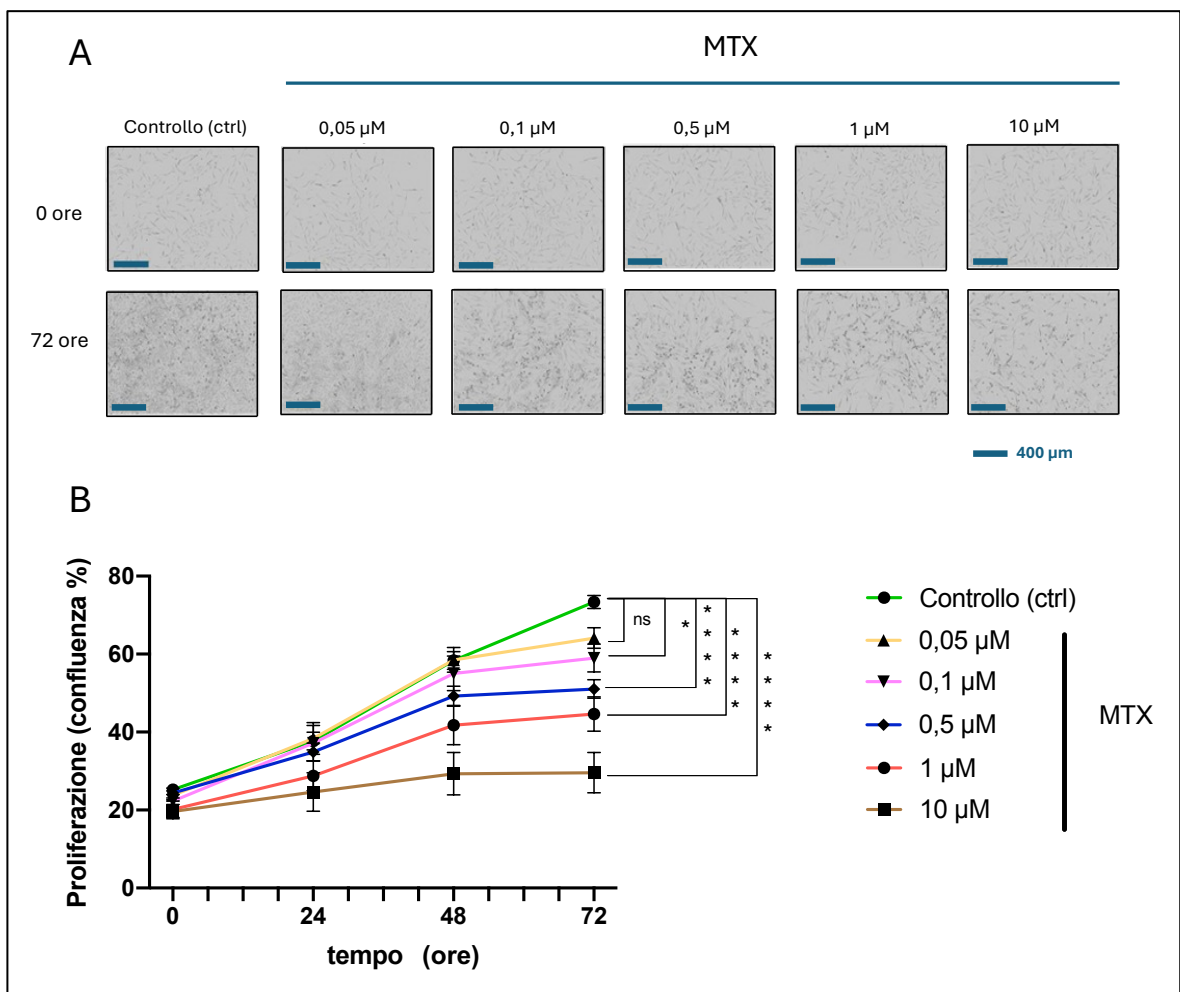


Figura 13. **Proliferazione delle cellule MG63 trattate con differenti concentrazioni di MTX.** Proliferazione delle cellule MG63 trattate con concentrazioni di MTX crescenti, come indicato in figura, e analizzate utilizzando lo strumento IncuCyte® Live-Cell Analysis System. **A** Immagini rappresentative delle cellule per ogni condizione a t=0 e a t=72 ore. **B** Curva di proliferazione ottenuta dall'analisi delle immagini. Sono state scattate 3 foto per ogni pozzetto, ogni 6 ore per 72 ore e le immagini sono state quantificate utilizzando il software IncuCyte® Zoom. Sono stati condotti tre esperimenti indipendenti e i valori sono il risultato della media \pm SEM di tre replicati biologici. SEM= errore standard della media. * = $P \leq 0,05$; **** = $P \leq 0,0001$.

L'analisi di proliferazione è stata condotta in tempo reale con lo strumento IncuCyte® che presenta al suo interno degli obiettivi che consentono di fotografare in autonomia ogni singolo pozzetto della piastra ad intervalli regolari per un determinato periodo di tempo. Grazie alle immagini scattate e all'utilizzo di un "software" è possibile valutare l'andamento della crescita cellulare in ogni pozzetto. La proliferazione è stata valutata in un lasso di tempo di 72 ore. Contrariamente a quanto atteso, dall'analisi dei dati non è emersa alcuna differenza significativa tra le cellule trasfettate con l'inibitore del miR-214 (anti-miR-214) o con il controllo (anti-ctrl) mantenute in terreno normale e le cellule trasfettate nello stesso modo e trattate con terreno contenente MTX 0,5 µM (anti-ctrl MTX e anti-miR-214 MTX) come mostrato dal grafico e dalle immagini rappresentative di singoli pozzetti scattate al t= 0, t= 24, t= 48 e t= 72 ore (Figura 14). È risultata apprezzabile solo una riduzione, se pur non statisticamente significativa, tra le cellule trasfettate con anti-ctrl e anti-miR-214 mantenute in terreno normale e le cellule trasfettate nello stesso modo e trattate con MTX 0,5 µM. L'avvenuta inibizione dell'espressione del miR-214 è stata valutata mediante PCR quantitativa Real Time preceduta da retrotrascrizione specifica per il miR-214 e per il piccolo RNA nucleare U44 usato come normalizzatore. Come è possibile osservare in Figura 16, il livello di espressione del miR-214 è risultato ridotto nelle cellule trasfettate con l'anti-miR-214 rispetto alle cellule trasfettate con la sequenza controllo (anti-ctrl).

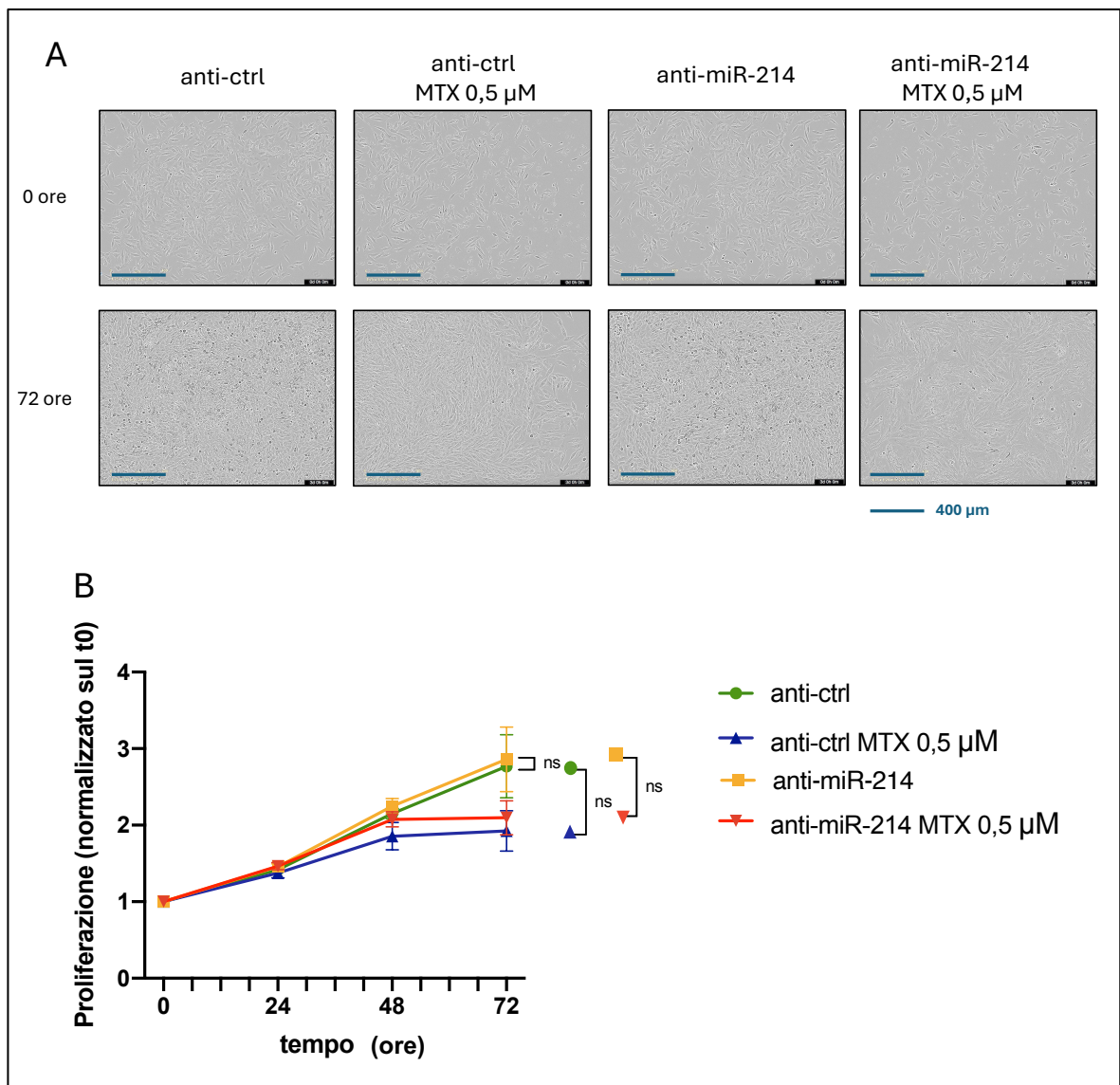


Figura 14. **Proliferazione in cellule MG63 trattate con un approccio combinato anti-miR-214 e MTX: analisi con lo strumento IncuCyte®.** Proliferazione delle cellule MG63 trasfettate con un inibitore del miR-214 (anti-miR-214) o con un controllo negativo (anti-ctrl) non trattate o sottoposte a trattamento con 0,5 μM MTX e analizzate utilizzando lo strumento IncuCyte® Live-Cell Analysis System. **A** Immagini rappresentative delle cellule per ogni condizione a t=0 e a t=72 ore. **B** Curva di proliferazione ottenuta dall'analisi delle immagini. Sono state scattate 3 foto per ogni pozzetto, ogni 6 ore per 72 ore e le immagini sono state quantificate utilizzando il software IncuCyte® Zoom. Sono stati condotti tre esperimenti indipendenti e i valori sono il risultato della media ± SEM di tre replicati biologici. SEM= errore standard della media, ns =non significativo.

Per avere una conferma del risultato di proliferazione ottenuto con IncuCyte®, è stato utilizzato in parallelo il reagente CCK-8 (Elabscience®) per valutare la vitalità cellulare. Questo saggio si basa sul principio che questo reagente può essere ridotto a formazano arancione in presenza di un reagente di accoppiamento elettronico da alcune deidrogenasi situate nei mitocondri. La quantità di formazano prodotta sarà direttamente proporzionale al numero di cellule vive e può essere misurato come assorbanza o densità ottica (DO) a 450

nm. Le cellule sono state trasfettate e trattate come indicato in precedenza e al t=0 e t=72 ore è stata effettuata l'analisi con CCK-8. In questa analisi di vitalità (Figura 15) è stata osservata una differenza significativa ($P \leq 0,01$) tra le cellule trasfettate con il controllo (anti-ctrl) e le cellule trattate con l'inibitore specifico per miR-214 (anti-miR-214) mantenute in terreno normale e le cellule trasfettate nello stesso modo e trattate con MTX 0,5 μ M (anti-ctrl MTX e anti-miR-214 MTX) in terreno normale, suggerendo che la vitalità tra le due coppie di gruppi è influenzata esclusivamente dall'utilizzo del chemioterapico MTX, ma non dall'inibizione del miR-214. I livelli ottenuti in seguito alla trasfezione transiente sono stati verificati mediante analisi di PCR quantitativa Real Time preceduta da retrotrascrizione (qRT-PCR). Come è possibile osservare dai grafici in Figura 16, l'espressione del miR-214 è risultata ridotta in seguito alla trasfezione delle cellule con l'inibitore specifico (anti-miR-214) se comparata con l'espressione osservata nelle cellule trasfettate con il controllo (anti-ctrl).

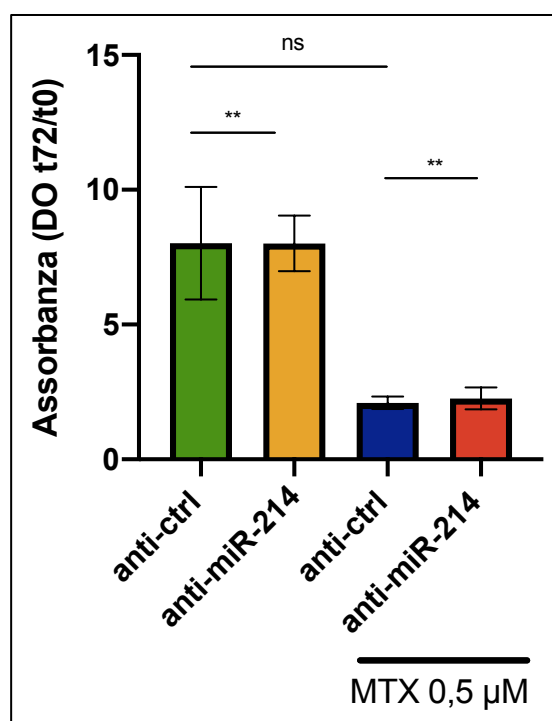


Figura 15. **Vitalità cellulare valutata in cellule MG63 trattate con un approccio combinato anti-miR-214 e MTX: analisi con saggio CCK-8**. Vitalità cellulare in cellule MG63 trasfettate con un inibitore del miR-214 (anti-miR-214) o con un controllo negativo (anti-ctrl) non trattate o sottoposte a trattamento con 0,5 μ M MTX e analizzate mediante il saggio CCK-8. La vitalità cellulare è stata valutata a t=0 e t=72 ore mediante lettura dell'assorbanza o densità ottica (DO) ad una lunghezza d'onda di 450 nm dopo l'aggiunta del reagente CCK8. Sono stati eseguiti 3 esperimenti indipendenti in triplicato e i risultati sono presentati come le medie delle assorbanze \pm (SD) dei tre esperimenti al t= 72 ore, normalizzate sul t=0 ore. SD= deviazione standard. ns= non significativo; ** = $P \leq 0,01$.

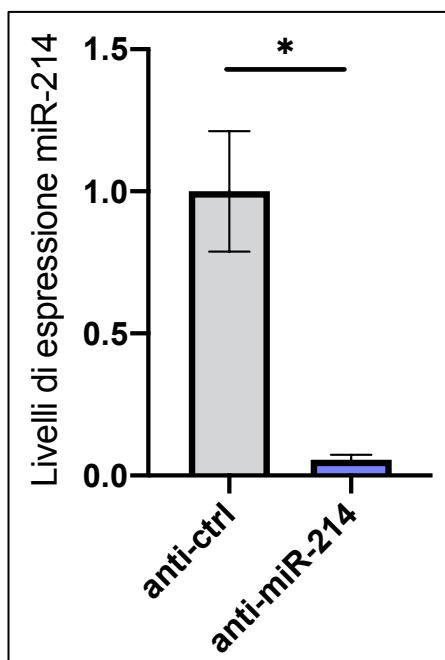


Figura 16. **Espressione del miR-214 in cellule MG63 in seguito a inibizione con anti-miRNA specifico.** Analisi dei livelli di espressione del miR-214 in cellule MG63 trasfettate con un inibitore del miR-214 (anti-miR-214) o con un controllo negativo (anti-ctrl). Sono stati eseguiti tre esperimenti indipendenti in triplicato e i risultati presentati come “fold change” (media ± SEM dei triplicati) relativi alla media di espressione delle cellule di controllo (anti-ctrl) normalizzati su RNU44. SEM=errore standard medio.* = $P \leq 0,05$.

4.4 L’inibizione dell’espressione del miR-214 (“knock-down”) in combinazione con il metotrexato non mostra alcun vantaggio nel bloccare la motilità delle cellule di OS.

Un ulteriore parametro di aggressività delle cellule tumorali è rappresentato dalla loro mobilità. La migrazione su modelli bidimensionali di cellule MG63 è stata valutata attraverso il saggio di riparazione della ferita o “wound healing”. Per verificare se l’inibizione dell’espressione di miR-214 in combinazione con il metotrexato (MTX) potesse influenzare la motilità delle cellule di OS, le cellule MG63 sono state trasfettate transientemente con un inibitore specifico per il miR-214 (anti-miR-214) o con una sequenza di controllo (anti-ctrl). Il giorno successivo alla trasfezione le cellule sono state staccate, poste in un terreno privo di siero e il giorno successivo è stata praticata una ferita a croce sul tappeto di cellule confluenti. Le immagini delle ferite sono state acquisite dopo 0, 16 e 24 ore (Figura 17A). Sebbene dopo 16 ore non ci fosse alcuna variazione statisticamente significativa (Figura 17B), dopo 24 ore le cellule trattate con MTX (anti-ctrl MTX, anti-miR-214 MTX) e le cellule trasfettate con il solo anti-miR-214, hanno mostrato una riduzione statisticamente significativa della motilità, ma non abbiamo evidenziato altre differenze. Non è stato quindi osservato alcun vantaggio dato dal trattamento combinato che prevede l’inibizione del miR-214 e il trattamento con MTX 0,5 μM (Figura 17).

I livelli di espressione del miR-214 ottenuti in seguito alla trasfezione transiente sono stati verificati mediante analisi di PCR quantitativa Real Time preceduta da retrotrascrizione (qRT-PCR). Come è possibile osservare dal grafico in Figura 18, l'espressione del miR-214 è risultata ridotta in seguito alla trasfezione delle cellule con l'inibitore specifico (anti-miR-214) se comparata con l'espressione osservata nelle cellule trasfettate con il controllo (anti-ctrl).

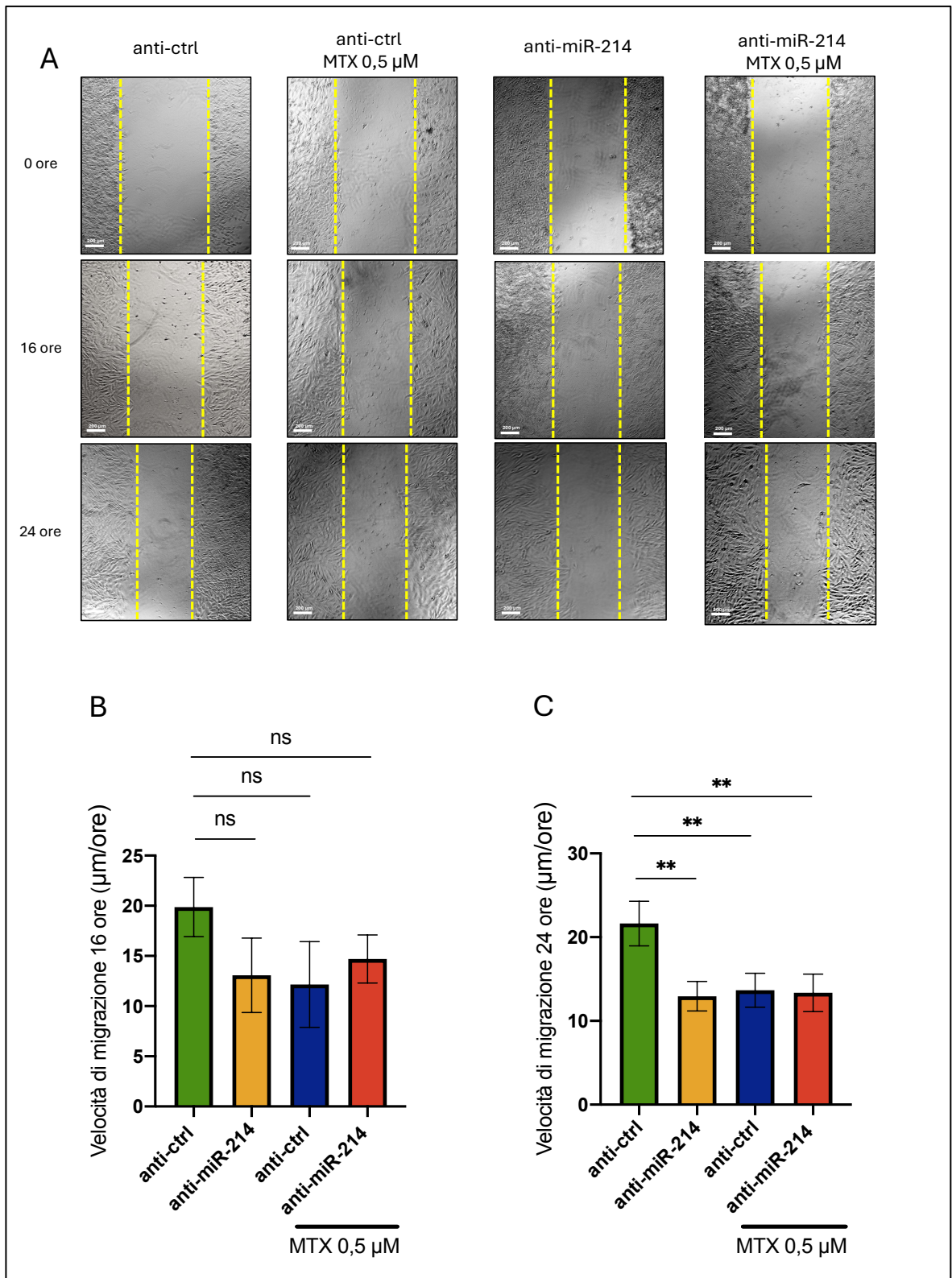


Figura 17. **Motilità cellulare valutata in cellule MG63 trattate con un approccio combinato anti-miR-214 e MTX: saggio di riparazione della ferita o “wound healing”.** Analisi della motilità cellulare mediante saggio di riparazione della ferita o “wound healing” in cellule MG63 trasfettate con un inibitore del miR-214 (anti-miR-214) o con un controllo negativo (anti-ctrl) non trattate o sottoposte a trattamento con 0,5 μM MTX. **A** Immagini rappresentative delle ferite acquisite per ogni condizione sperimentare a t=0, t=16 e t=24 ore. **B**, **C** I grafici rappresentano la velocità di migrazione delle cellule a t=16 e t=24 ore dal momento in cui è stata praticata la ferita. Sono stati eseguiti tre esperimenti indipendenti in triplicato e i risultati presentati come media ± SEM della distanza/tempo (μm/ora) coperta dalle cellule migranti calcolata su 4 immagini per ogni triplicato. SEM=errore standard medio; ns= non significativo; ** =P<0,01.

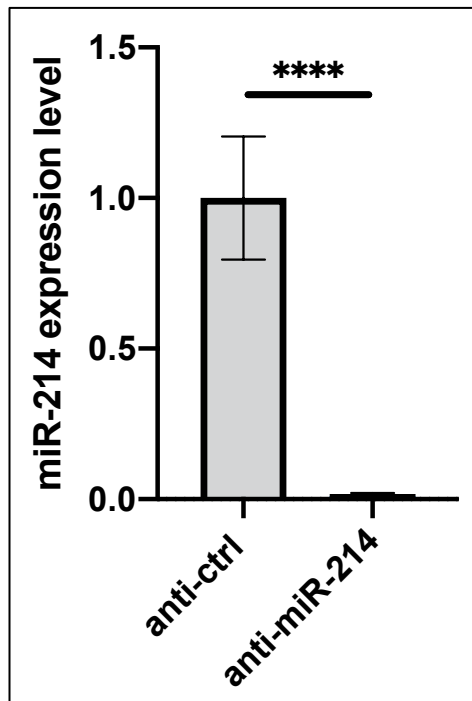


Figura 18. **Espressione del miR-214 in cellule MG63 in seguito a inibizione con anti-miRNA specifico.** Analisi dei livelli di espressione del miR-214 in cellule MG63 trasfettate con un inibitore del miR-214 (anti-miR-214) o con un controllo negativo (anti-ctrl). Sono stati eseguiti tre esperimenti indipendenti in triplicato e i risultati presentati come “fold change” (media ± SEM dei triplicati) relativi alla media di espressione delle cellule di controllo (anti-ctrl) normalizzati su RNU44. SEM=errore standard medio. **** = $P \leq 0,0001$.

5. DISCUSSIONE

È ormai ampiamente noto che i livelli di miR-214 sono elevati in diversi tipi di tumore, tra cui quello al seno, al pancreas, nel melanoma, e nell'osteosarcoma (Penna et al., 2011; Z. Wang et al., 2014; Xu and Wang, 2014) e che generalmente correlano con una prognosi infausta (Cole et al., 2022; Z. Wang et al., 2014). In particolare, è stato dimostrato che una sovraespressione del miR-214 in linee cellulari di OS è in grado di promuovere la proliferazione (Zhu et al., 2017) e la capacità delle cellule di migrare e invadere (Cai et al., 2018; Xu and Wang, 2014). Inoltre, alti livelli di miR-214 sono stati associati con l'insorgenza di radio- (Li et al., 2019) e chemio- (Song et al., 2017) resistenza in cellule di OS, suggerendo un suo coinvolgimento nei meccanismi di resistenza alle terapie. In questo lavoro di tesi, ci siamo proposti di valutare se l'inibizione del miR-214 potesse favorire la risposta delle cellule di OS ad un serie di farmaci la cui efficacia risulta inferiore in presenza di alti livelli di miR-214. A tale scopo, abbiamo identificato, attraverso un'analisi bioinformatica, 11 potenziali farmaci la cui IC50 risulta aumentata in presenza di alti livelli di miR-214 e per i quali una concomitante inibizione dell'espressione di miR-214 potrebbe risultare in un aumento della loro efficacia. Essendo il metotrexato (MTX) uno dei farmaci correntemente utilizzati in clinica per il trattamento dell'OS e facendo parte della lista degli 11 farmaci individuati dall'analisi bioinformatica, abbiamo deciso di verificare se effettivamente l'efficacia del MTX potesse aumentare in presenza di bassi livelli di miR-214.

A tale scopo abbiamo pensato di generare un modello delecto per l'espressione del miR-214 adottando un approccio CRISPR/Cas9 e utilizzando i plasmidi contenenti 2 differenti RNA guida diretti contro la sequenza del miR-214 e la Cas9 che ci sono stati forniti dal laboratorio della Prof.ssa Turco (Molecular Biotechnology Center, UniTo, Italy). Per mettere a punto il protocollo di delezione del gene Hsa-miR-214, abbiamo scelto di usare le cellule HEK293T caratterizzate da un elevato livello di trasfettabilità. Nonostante il successo della trasfezione, come si può evincere dalla sopravvivenza delle cellule alla selezione con puromicina, il cui gene PuroR è contenuto nei plasmidi PX459 sgRNA 2 e PX459 sgRNA 3 (Figura 6), non abbiamo osservato una totale ablazione dell'espressione del miR-214, ma solo una riduzione della sua espressione. Le ragioni di questo successo parziale potrebbero essere molteplici. È possibile, per esempio, che la modificazione della sequenza ottenuta in seguito alla nostra trasfezione sia avvenuta a carico di una sola copia del gene del miR-214 cioè in una condizione di eterozigosi e non in omozigosi come desiderato. Ci proponiamo

quindi di verificare a livello genomico la presenza della alterazione di sequenza desiderata mediante PCR della regione interessata dalla modificazione seguita da sequenziamento. Inoltre, è necessario considerare la complessità del *locus* del gene Hsa-miR-214. Come descritto in Figura 5, il gene del miR-214 si trova all'interno del gene della Dinamina-3, dove è presente anche un lungo RNA antisenso non codificante (DNM3os). Inoltre, a 6kb dal gene Hsa-miR-214, si trovano le sequenze dei geni codificanti per i miR-199a-2 e miR-3120. Il contesto genico così complesso ha imposto restrizioni di sequenza importanti durante il disegno degli RNA guida che possono aver pregiudicato la funzionalità delle sequenze. Nonostante ciò, un simile approccio rimane comunque applicabile in seguito ad ulteriore ottimizzazione, come testimoniato dalla delezione del gene Hsa-miR-214 ottenuta da Sen e colleghi in cellule di cancro della cervice (Sen et al., 2020). Sebbene le guide utilizzate in questo lavoro si siano dimostrate efficaci, l'allineamento delle sequenze utilizzate con la sequenza del gene di miR-214 non ha prodotto alcuna corrispondenza. Non essendo presenti in letteratura altri lavori che utilizzino il sistema CRISPR/Cas9, procederemo con l'ottimizzazione delle condizioni di utilizzo delle nostre sequenze. Infine, un'altra possibile spiegazione potrebbe celarsi nella linea cellulare usata, le HEK293T. Essendo cellule di carcinoma embrionale renale è plausibile che queste cellule presentino elevati livelli di miR-214, a causa di possibili amplificazioni e duplicazioni del gene da verificare a livello genomico. Inoltre, ci proponiamo di provare a depletare il gene del miR-214 in una linea cellulare non tumorale ad elevata trasfettabilità per verificare se in questo caso il sistema funzioni in modo più efficiente di quanto osservato nelle cellule tumorali.

Per ovviare alle criticità evidenziate da questo approccio, abbiamo deciso di utilizzare un metodo diverso volto all'inibizione del miR-214 mediante l'utilizzo di un anti-miRNA-214, un oligonucleotide antisense, che inibendo l'espressione del miRNA, ne dovrebbe ridurre anche i suoi effetti pro-tumorali. Abbiamo quindi inibito l'espressione del miR-214 in cellule di OS in assenza o in presenza di MTX ed effettuato un saggio di proliferazione, vitalità e di migrazione per valutare se il trattamento combinato avesse un vantaggio rispetto ai singoli trattamenti. Per la proliferazione e la vitalità cellulare sono state utilizzate due metodiche differenti l'IncuCyte® e il saggio CCK-8. Con l'impiego dell'IncuCyte® non sono state osservate differenze statisticamente significative nei singoli trattamenti e nel trattamento combinato, mentre il saggio CCK-8 ci ha permesso di osservare una riduzione della vitalità in seguito al trattamento con MTX sia in presenza di un anti-miRNA di controllo sia in presenza di anti-miR-214; mentre nessuna riduzione di vitalità è stata osservata in seguito al singolo trattamento con anti-miR-214, in disaccordo con la

letteratura (Cai et al., 2018; Xu and Wang, 2014). Per quanto riguarda i risultati ottenuti con Incucyte®, l'assenza di differenze significative in tutte le condizioni potrebbe essere dovuta ad un problema nella creazione della maschera, ovvero il sistema con cui il "software" dell'Incucyte®, attraverso un algoritmo, individua le cellule per l'analisi delle immagini. Dalle analisi di vitalità con CCK-8 si è potuto osservare come non vi sia un miglioramento della sensibilità al MTX nelle cellule MG63 trattate con anti-miR-214.

Come detto precedentemente, miR-214 promuove i tratti metastatici delle cellule di OS quali migrazione e invasione (Cai et al., 2018; Xu and Wang, 2014), abbiamo quindi valutato l'effetto del trattamento singolo e combinato sulla capacità delle cellule di muoversi in un saggio di riparazione della ferita ("wound healing"). Abbiamo osservato come l'inibizione di miR-214 sia in grado di ridurre la capacità delle cellule MG63 di muoversi, in accordo con la letteratura (Cai et al., 2018; Xu and Wang, 2014) e i nostri dati di laboratorio. Tuttavia, il trattamento combinato di inibizione di miR-214 e MTX non ha mostrato alcun vantaggio nel diminuire la capacità di migrazione delle cellule MG63. Alla base del fatto che non abbiamo osservato sinergia tra l'inibizione di miR-214 e il trattamento con MTX, potrebbe esserci il fatto che le cellule di MG63 non presentano livelli di miR-214 molto elevati in basale. Potrebbe risultare interessante effettuare saggi di proliferazione su una seconda linea cellulare di OS, come ad esempio le U2OS che esprimono livelli più alti di miR-214 a livello basale. È necessario anche considerare che nella lista dei farmaci predetti MTX presentava un p-value di 0,05; mentre altri farmaci mostravano un p-value sensibilmente migliore. Questo potrebbe anche spiegare perché non sia stato osservato alcun vantaggio dal trattamento combinato di inibizione di miR-214 e MTX. Per quanto riguarda gli altri farmaci individuati dalla nostra analisi, per alcuni di essi (JNK inhibitor VIII, Capivasertib, 5Z)-7-Oxozeaenol, AZD6738 e TTK_3146) non sono noti in letteratura studi che ne provino l'utilizzo in OS. Al contrario, per il composto WZ3105, Mrozek e colleghi hanno mostrato un suo effetto inibitorio sulla proliferazione cellulare di cellule CAL72 di OS (Mrozek et al., 2021). Chen e colleghi hanno invece dimostrato come l'utilizzo di IMD-0354 sia in grado di ridurre la proliferazione e la migrazione in cellule MG63 e U2OS (Chen et al., 2021). Anche per il composto SL0101, è stata dimostrata la sua efficacia nel ridurre la proliferazione, la migrazione e la sintesi proteica in cellule di OS (Sun et al., 2023) attraverso la sua azione inibitoria sul bersaglio molecolare RSK (Ribosoma S6 Kinase). Il trattamento con Serdemetan, invece, riduce le dimensioni del tumore di OS in modelli murini (Smith et al., 2012) e infine, Piperlongumine, utilizzato su cellule MG63, nel lavoro condotto da Zhou e colleghi blocca il ciclo cellulare e aumenta il livello di apoptosi (Zhou et al., 2020).

Essendo la maggior parte di questi dei farmaci già utilizzati in OS, se pur non in clinica e avendo questi composti un'elevata significatività statistica nella nostra analisi, potrebbe essere utile in futuro focalizzarsi sull'utilizzo di questi composti in combinazione con l'inibizione di miR-214.

6. CONCLUSIONI

In conclusione, gli esperimenti condotti hanno dimostrato che la sola inibizione di miR-214 in cellule di OS non ha effetti sulla proliferazione cellulare ma solo sulla migrazione. Tuttavia, benché il miR-214 riduca la capacità migratoria delle cellule MG63, non è stato osservato alcun vantaggio nel trattamento combinato con MTX come invece ipotizzato sulla base della nostra analisi bioinformatica. Nonostante ciò, ulteriori analisi su linee di OS esprimenti alti livelli di miR-214 o coltivate in sistemi 3D che più si avvicinano alle condizioni *in vivo* sono necessari per escludere un effetto sinergico in contesti dove i livelli di miR-214 risultino elevati. Inoltre, la nostra predizione ha portato all'identificazione di altri 10 composti, la cui efficacia potrebbe beneficiare dell'inibizione del miR-214, ci proponiamo quindi in futuro di valutare altri farmaci presenti nella nostra lista.

7. BIBLIOGRAFIA

- Ahmed, M.I., Alam, M., Emelianov, V.U., Poterlowicz, K., Patel, A., Sharov, A.A., Mardaryev, A.N., Botchkareva, N.V., 2014. MicroRNA-214 controls skin and hair follicle development by modulating the activity of the Wnt pathway. *J. Cell Biol.* 207, 549–567. <https://doi.org/10.1083/jcb.201404001>
- Alarcón, C.R., Lee, H., Goodarzi, H., Halberg, N., Tavazoie, S.F., 2015. N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature* 519, 482–485. <https://doi.org/10.1038/nature14281>
- Alfaro, I., Vega, M., Romero, C., Garrido, M.P., 2023. Mechanisms of Regulation of the Expression of miRNAs and lncRNAs by Metformin in Ovarian Cancer. *Pharmaceuticals* 16, 1515. <https://doi.org/10.3390/ph16111515>
- Babiarz, J.E., Ruby, J.G., Wang, Y., Bartel, D.P., Blelloch, R., 2008. Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev.* 22, 2773–2785. <https://doi.org/10.1101/gad.1705308>
- Bae, Y., Yang, T., Zeng, H.-C., Campeau, P.M., Chen, Y., Bertin, T., Dawson, B.C., Munivez, E., Tao, J., Lee, B.H., 2012. miRNA-34c regulates Notch signaling during bone development. *Hum. Mol. Genet.* 21, 2991–3000. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds129>
- Beird, H.C., Bielack, S.S., Flanagan, A.M., Gill, J., Heymann, D., Janeway, K.A., Livingston, J.A., Roberts, R.D., Strauss, S.J., Gorlick, R., 2022. Osteosarcoma. *Nat. Rev. Dis. Primer* 8, 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41572-022-00409-y>
- Bertoni, F., Bacchini, P., 1998. Classification of bone tumors. *Classif. Bone Tumors* S74–S76. [https://doi.org/10.1016/S0720-048X\(98\)00046-1](https://doi.org/10.1016/S0720-048X(98)00046-1)
- Bielack, S.S., Kempf-Bielack, B., Delling, G., Exner, G.U., Flege, S., Helmke, K., Kotz, R., Salzer-Kuntschik, M., Werner, M., Winkelmann, W., Zoubek, A., Jürgens, H., Winkler, K., 2016. Prognostic Factors in High-Grade Osteosarcoma of the Extremities or Trunk: An Analysis of 1,702 Patients Treated on Neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group Protocols. *J. Clin. Oncol.* <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.20.3.776>
- Bielack, S.S., Smeland, S., Whelan, J.S., Marina, N., Jovic, G., Hook, J.M., Krailo, M.D., Gebhardt, M., Pápai, Z., Meyer, J., Nadel, H., Randall, R.L., Deffenbaugh, C., Nagarajan, R., Brennan, B., Letson, G.D., Teot, L.A., Goorin, A., Baumhoer, D., Kager, L., Werner, M., Lau, C.C., Hall, K.S., Gelderblom, H., Meyers, P., Gorlick,

- R., Windhager, R., Helmke, K., Eriksson, M., Hoogerbrugge, P.M., Schomberg, P., Tunn, P.-U., Kühne, T., Jürgens, H., Berg, H. van den, Böhling, T., Picton, S., Renard, M., Reichardt, P., Gerss, J., Butterfass-Bahloul, T., Morris, C., Hogendoorn, P.C.W., Seddon, B., Calaminus, G., Michelagnoli, M., Dhooge, C., Sydes, M.R., Bernstein, M., 2015. Methotrexate, Doxorubicin, and Cisplatin (MAP) Plus Maintenance Pegylated Interferon Alfa-2b Versus MAP Alone in Patients With Resectable High-Grade Osteosarcoma and Good Histologic Response to Preoperative MAP: First Results of the EURAMOS-1 Good Response Randomized Controlled Trial. *J. Clin. Oncol.* <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.60.0734>
- Blenkiron, C., Goldstein, L.D., Thorne, N.P., Spiteri, I., Chin, S.-F., Dunning, M.J., Barbosa-Morais, N.L., Teschendorff, A.E., Green, A.R., Ellis, I.O., Tavaré, S., Caldas, C., Miska, E.A., 2007. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol.* 8. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-10-r214>
- Bookout, A.L., Mangelsdorf, D.J., 2003. Quantitative real-time PCR protocol for analysis of nuclear receptor signaling pathways. *Nucl. Recept. Signal.* 1, nrs.01012. <https://doi.org/10.1621/nrs.01012>
- Brard, C., Piperno-Neumann, S., Delaye, J., Brugières, L., Hampson, L.V., Le Teuff, G., Le Deley, M.-C., Gaspar, N., 2019. Sarcome-13/OS2016 trial protocol: a multicentre, randomised, open-label, phase II trial of mifamurtide combined with postoperative chemotherapy for patients with newly diagnosed high-risk osteosarcoma. *BMJ Open* 9, e025877. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-025877>
- Cai, H., Miao, M., Wang, Z., 2018. miR-214-3p promotes the proliferation, migration and invasion of osteosarcoma cells by targeting CADM1. *Oncol. Lett.* 16, 2620–2628. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8927>
- Calin, G.A., Croce, C.M., 2006. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat. Rev. Cancer* 6, 857–866. <https://doi.org/10.1038/nrc1997>
- Calvert, G.T., Randall, R.L., Jones, K.B., Cannon-Albright, L., Lessnick, S., Schiffman, J.D., 2012. At-Risk Populations for Osteosarcoma: The Syndromes and Beyond. *Sarcoma* 2012, 152382. <https://doi.org/10.1155/2012/152382>
- Carrà, G., Petiti, J., Tolino, F., Vacca, R., Orso, F., 2024. MicroRNAs in metabolism for precision treatment of lung cancer. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 29, 121. <https://doi.org/10.1186/s11658-024-00632-3>

- Cheloufi, S., Dos Santos, C.O., Chong, M.M.W., Hannon, G.J., 2010. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* 465, 584–589. <https://doi.org/10.1038/nature09092>
- Chen, D., Wang, Z., Zeng, Z., Wu, W., Zhang, D., Luo, H., Wang, Feng, Qiu, M., Wang, D., Ren, C., Wang, Feng-hua, Chiao, L.J., Pelicano, H., Huang, P., Li, Y., Xu, R., 2014. Identification of MicroRNA-214 as a negative regulator of colorectal cancer liver metastasis by way of regulation of fibroblast growth factor receptor 1 expression. *Hepatology* 60, 598–609. <https://doi.org/10.1002/hep.27118>
- Chen, Xiaojing, Wang, G., Mohammed Alsayed, A.M., Du, Z., Lu liu, Ma, Y., Liu, P., Zhang, Q., Chen, Xianxin, Chen, W., Ye, F., Zheng, X., Liu, Z., 2021. Synthesis and biological evaluation of novel *N*-substituted benzamides as anti-migration agents for treatment of osteosarcoma. *Eur. J. Med. Chem.* 214, 113203. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113203>
- Chou, A.J., Kleinerman, E.S., Krailo, M.D., Chen, Z., Betcher, D.L., Healey, J.H., Conrad III, E.U., Nieder, M.L., Weiner, M.A., Wells, R.J., Womer, R.B., Meyers, P.A., Group, on behalf of the C.O., 2009. Addition of muramyl tripeptide to chemotherapy for patients with newly diagnosed metastatic osteosarcoma. *Cancer* 115, 5339–5348. <https://doi.org/10.1002/cncr.24566>
- Cimino, D., De Pittà, C., Orso, F., Zampini, M., Casara, S., Penna, E., Quaglino, E., Forni, M., Damasco, C., Pinatel, E., Ponzzone, R., Romualdi, C., Brisken, C., De Bortoli, M., Biglia, N., Provero, P., Lanfranchi, G., Taverna, D., 2013. miR148b is a major coordinator of breast cancer progression in a relapse-associated microRNA signature by targeting ITGA5, ROCK1, PIK3CA, NRAS, and CSF1. *FASEB J.* 27, 1223–1235. <https://doi.org/10.1096/fj.12-214692>
- Cole, S., Gianferante, D.M., Zhu, B., Mirabello, L., 2022. Osteosarcoma: A Surveillance, Epidemiology, and End Results program-based analysis from 1975 to 2017. *Cancer* 128, 2107–2118. <https://doi.org/10.1002/cncr.34163>
- Creighton, C.J., Fountain, M.D., Yu, Z., Nagaraja, A.K., Zhu, H., Khan, M., Olokpa, E., Zariff, A., Gunaratne, P.H., Matzuk, M.M., Anderson, M.L., 2010. Molecular Profiling Uncovers a p53-Associated Role for MicroRNA-31 in Inhibiting the Proliferation of Serous Ovarian Carcinomas and Other Cancers. *Cancer Res.* 70, 1906–1915. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3875>
- Deng, M., Ye, Q., Qin, Z., Zheng, Y., He, W., Tang, H., Zhou, Y., Xiong, W., Zhou, M., Li, X., Yan, Q., Ma, J., Li, G., 2013. miR-214 promotes tumorigenesis by targeting

- lactotransferrin in nasopharyngeal carcinoma. *Tumor Biol.* 34, 1793–1800. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-0718-y>
- Denli, A.M., Tops, B.B.J., Plasterk, R.H.A., Ketting, R.F., Hannon, G.J., 2004. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432, 231–235. <https://doi.org/10.1038/nature03049>
- Derfoul, A., Juan, A.H., Difilippantonio, M.J., Palanisamy, N., Ried, T., Sartorelli, V., 2011. Decreased microRNA-214 levels in breast cancer cells coincides with increased cell proliferation, invasion and accumulation of the Polycomb Ezh2 methyltransferase. *Carcinogenesis* 32, 1607–1614. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr184>
- Di Leva, G., Garofalo, M., Croce, C.M., 2014. MicroRNAs in Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 9, 287–314. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104715>
- Duan, Q., Wang, X., Gong, W., Ni, L., Chen, C., He, X., Chen, F., Yang, L., Wang, P., Wang, D.W., 2012. ER Stress Negatively Modulates the Expression of the miR-199a/214 Cluster to Regulates Tumor Survival and Progression in Human Hepatocellular Cancer. *PLOS ONE* 7, e31518. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031518>
- Dvinge, H., Git, A., Gräf, S., Salmon-Divon, M., Curtis, C., Sottoriva, A., Zhao, Y., Hirst, M., Armisen, J., Miska, E.A., Chin, S.-F., Provenzano, E., Turashvili, G., Green, A., Ellis, I., Aparicio, S., Caldas, C., 2013. The shaping and functional consequences of the microRNA landscape in breast cancer. *Nature* 497, 378–382. <https://doi.org/10.1038/nature12108>
- Forterre, A., Komuro, H., Aminova, S., Harada, M., 2020. A Comprehensive Review of Cancer MicroRNA Therapeutic Delivery Strategies. *Cancers* 12, 1852. <https://doi.org/10.3390/cancers12071852>
- Gao, Y., Luo, L., Li, S., Yang, C., 2014. miR-17 inhibitor suppressed osteosarcoma tumor growth and metastasis via increasing PTEN expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 444, 230–234. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.01.061>
- Ghandi, M., Huang, F.W., Jané-Valbuena, J., Kryukov, G.V., Lo, C.C., McDonald, E.R., Barretina, J., Gelfand, E.T., Bielski, C.M., Li, H., Hu, K., Andreev-Drakhlin, A.Y., Kim, J., Hess, J.M., Haas, B.J., Aguet, F., Weir, B.A., Rothberg, M.V., Paolella, B.R., Lawrence, M.S., Akbani, R., Lu, Y., Tiv, H.L., Gokhale, P.C., de Weck, A., Mansour, A.A., Oh, C., Shih, J., Hadi, K., Rosen, Y., Bistline, J., Venkatesan, K., Reddy, A., Sonkin, D., Liu, M., Lehar, J., Korn, J.M., Porter, D.A., Jones, M.D., Golji, J., Caponigro, G., Taylor, J.E., Dunning, C.M., Creech, A.L., Warren, A.C., McFarland, J.M., Zamanighomi, M., Kauffmann, A., Stransky, N., Imielinski, M., Maruvka, Y.E., Cherniack, A.D., Tsherniak, A., Vazquez, F., Jaffe, J.D., Lane, A.A., Weinstock,

- D.M., Johannessen, C.M., Morrissey, M.P., Stegmeier, F., Schlegel, R., Hahn, W.C., Getz, G., Mills, G.B., Boehm, J.S., Golub, T.R., Garraway, L.A., Sellers, W.R., 2019. Next-generation characterization of the Cancer Cell Line Encyclopedia. *Nature* 569, 503–508. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1186-3>
- Grada, A., Otero-Vinas, M., Prieto-Castrillo, F., Obagi, Z., Falanga, V., 2017. Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. *J. Invest. Dermatol.* 137, e11–e16. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.11.020>
- Gutiérrez, N.C., Sarasquete, M.E., Misiewicz-Krzeminska, I., Delgado, M., De Las Rivas, J., Ticona, F.V., Ferriñán, E., Martín-Jiménez, P., Chillón, C., Risueño, A., Hernández, J.M., García-Sanz, R., González, M., San Miguel, J.F., 2010. Deregulation of microRNA expression in the different genetic subtypes of multiple myeloma and correlation with gene expression profiling. *Leukemia* 24, 629–637. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.274>
- Hameed, M., Mandelker, D., 2018. Tumor Syndromes Predisposing to Osteosarcoma. *Adv. Anat. Pathol.* 25, 217. <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000190>
- He, C., Xiong, J., Xu, X., Lu, W., Liu, L., Xiao, D., Wang, D., 2009. Functional elucidation of MiR-34 in osteosarcoma cells and primary tumor samples. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.07.101>
- Hou, C.-H., Lin, F.-L., Tong, K.-B., Hou, S.-M., Liu, J.-F., 2014. Transforming growth factor alpha promotes osteosarcoma metastasis by ICAM-1 and PI3K/Akt signaling pathway. *Biochem. Pharmacol.* 89, 453–463. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.03.010>
- Huang, S.H., Mo, D., Meller, J., Wagner, M., 2012. Identifying a small set of marker genes using minimum expected cost of misclassification. *Artif. Intell. Med.* 55, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.artmed.2012.01.004>
- Hughes, D.P.M., 2010. How the NOTCH Pathway Contributes to the Ability of Osteosarcoma Cells to Metastasize, in: Jaffe, N., Bruland, O.S., Bielack, S. (Eds.), *Pediatric and Adolescent Osteosarcoma*. Springer US, Boston, MA, pp. 479–496. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0284-9_28
- Iorio, F., Knijnenburg, T.A., Vis, D.J., Bignell, G.R., Menden, M.P., Schubert, M., Aben, N., Gonçalves, E., Barthorpe, S., Lightfoot, H., Cokelaer, T., Greninger, P., van Dyk, E., Chang, H., de Silva, H., Heyn, H., Deng, X., Egan, R.K., Liu, Q., Mironenko, T., Mitropoulos, X., Richardson, L., Wang, J., Zhang, T., Moran, S., Sayols, S., Soleimani, M., Tamborero, D., Lopez-Bigas, N., Ross-Macdonald, P., Esteller, M.,

- Gray, N.S., Haber, D.A., Stratton, M.R., Benes, C.H., Wessels, L.F.A., Saez-Rodriguez, J., McDermott, U., Garnett, M.J., 2016. A Landscape of Pharmacogenomic Interactions in Cancer. *Cell* 166, 740–754. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.017>
- Iorio, M.V., Visone, R., Di Leva, G., Donati, V., Petrocca, F., Casalini, P., Taccioli, C., Volinia, S., Liu, C.-G., Alder, H., Calin, G.A., Ménard, S., Croce, C.M., 2007. MicroRNA Signatures in Human Ovarian Cancer. *Cancer Res.* 67, 8699–8707. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1936>
- Isakoff, M.S., Bielack, S.S., Meltzer, P., Gorlick, R., 2015. Osteosarcoma: Current Treatment and a Collaborative Pathway to Success. *J. Clin. Oncol.* 33, 3029–3035. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.4895>
- Jones, K.B., 2011. Osteosarcomagenesis: Modeling Cancer Initiation in the Mouse. *Sarcoma* 2011, 694136. <https://doi.org/10.1155/2011/694136>
- Kager, L., Zoubek, A., Pötschger, U., Kastner, U., Flege, S., Kempf-Bielack, B., Branscheid, D., Kotz, R., Salzer-Kuntschik, M., Winkelmann, W., Jundt, G., Kabisch, H., Reichardt, P., Jürgens, H., Gadner, H., Bielack, S.S., 2003. Primary Metastatic Osteosarcoma: Presentation and Outcome of Patients Treated on Neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group Protocols. *J. Clin. Oncol.* 21, 2011–2018. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.08.132>
- Karimi, E., Dehghani, A., Azari, H., Zarei, M., Shekari, M., Mousavi, P., 2023. Molecular Mechanisms of miR-214 Involved in Cancer and Drug Resistance. *Curr. Mol. Med.* 23, 589–605. <https://doi.org/10.2174/1566524022666220428112744>
- Kelly, A.D., Haibe-Kains, B., Janeway, K.A., Hill, K.E., Howe, E., Goldsmith, J., Kurek, K., Perez-Atayde, A.R., Francoeur, N., Fan, J.-B., April, C., Schneider, H., Gebhardt, M.C., Culhane, A., Quackenbush, J., Spentzos, D., 2013. MicroRNA paraffin-based studies in osteosarcoma reveal reproducible independent prognostic profiles at 14q32. *Genome Med.* 5, 2. <https://doi.org/10.1186/gm406>
- Klein, M.J., Siegal, G.P., 2006. Osteosarcoma: Anatomic and Histologic Variants. *Am. J. Clin. Pathol.* 125, 555–581. <https://doi.org/10.1309/UC6KQHLD9LV2KENN>
- Kumar, M.S., Pester, R.E., Chen, C.Y., Lane, K., Chin, C., Lu, J., Kirsch, D.G., Golub, T.R., Jacks, T., 2009. Dicer1 functions as a haploinsufficient tumor suppressor. *Genes Dev.* 23, 2700–2704. <https://doi.org/10.1101/gad.1848209>
- Lambertz, I., Nittner, D., Mestdagh, P., Denecker, G., Vandesompele, J., Dyer, M.A., Marine, J.-C., 2010. Monoallelic but not biallelic loss of Dicer1 promotes tumorigenesis in vivo. *Cell Death Differ.* 17, 633–641. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.202>

- Lee, Y., 2002. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* 21, 4663–4670. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf476>
- Li, B., Shi, J., Li, G., Li, H., 2012. Design of Electromagnetic Pre-Pressure Device for 3-DOF Spherical Ultrasonic Motor. *Procedia Eng.* 29, 2393–2398. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.01.321>
- Li, G., Cai, M., Fu, D., Chen, K., Sun, M., Cai, Z., Cheng, B., 2012. Heat Shock Protein 90B1 Plays an Oncogenic Role and is a Target of microRNA-223 in Human Osteosarcoma. *Cell. Physiol. Biochem.* 30, 1481–1490. <https://doi.org/10.1159/000343336>
- Li, J., You, T., Jing, J., 2014. MiR-125b inhibits cell biological progression of Ewing's sarcoma by suppressing the PI3K/Akt signalling pathway. *Cell Prolif.* 47, 152–160. <https://doi.org/10.1111/cpr.12093>
- Li, Y., Song, X., Liu, Z., Li, Q., Huang, M., Su, B., Mao, Y., Wang, Y., Mo, W., Chen, H., 2019. Upregulation of miR-214 Induced Radioresistance of Osteosarcoma by Targeting PHLDA2 via PI3K/Akt Signaling. *Front. Oncol.* 9, 298. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00298>
- Li, Y., Zhang, J., Zhang, L., Si, M., Yin, H., Li, J., 2013. Diallyl trisulfide inhibits proliferation, invasion and angiogenesis of osteosarcoma cells by switching on suppressor microRNAs and inactivating of Notch-1 signaling. *Carcinogenesis* 34, 1601–1610. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt065>
- Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., Downing, J.R., Jacks, T., Horvitz, H.R., Golub, T.R., 2005. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435, 834–838. <https://doi.org/10.1038/nature03702>
- Lu, L., Jin, W., Wang, L.L., 2020. RECQ DNA Helicases and Osteosarcoma, in: Kleinerman, E.S., Gorlick, R. (Eds.), *Current Advances in the Science of Osteosarcoma: Research Perspectives: Tumor Biology, Organ Microenvironment, Potential New Therapeutic Targets, and Canine Models*. Springer International Publishing, Cham, pp. 37–54. https://doi.org/10.1007/978-3-030-43085-6_3
- Marchini, S., Cavalieri, D., Fruscio, R., Calura, E., Garavaglia, D., Nerini, I.F., Mangioni, C., Cattoretti, G., Clivio, L., Beltrame, L., Katsaros, D., Scarampi, L., Menato, G., Perego, P., Chiorino, G., Buda, A., Romualdi, C., D'Incalci, M., 2011. Association between miR-200c and the survival of patients with stage I epithelial ovarian cancer: a retrospective study of two independent tumour tissue collections. *Lancet Oncol.* 12, 273–285. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70012-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70012-2)

- Martin, J.W., Chilton-MacNeill, S., Koti, M., Van Wijnen, A.J., Squire, J.A., Zielenska, M., 2014. Digital Expression Profiling Identifies RUNX2, CDC5L, MDM2, RECQL4, and CDK4 as Potential Predictive Biomarkers for Neo-Adjuvant Chemotherapy Response in Paediatric Osteosarcoma. *PLoS ONE* 9, e95843. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095843>
- McDermott, A.M., Heneghan, H.M., Miller, N., Kerin, M.J., 2011. The Therapeutic Potential of MicroRNAs: Disease Modulators and Drug Targets. *Pharm. Res.* 28, 3016–3029. <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0550-2>
- Meazza, C., Asaftei, S.D., 2021. State-of-the-art, approved therapeutics for the pharmacological management of osteosarcoma. *Expert Opin. Pharmacother.* 22, 1995–2006. <https://doi.org/10.1080/14656566.2021.1936499>
- Mirabello, L., Pfeiffer, R., Murphy, G., Daw, N.C., Patiño-Garcia, A., Troisi, R.J., Hoover, R.N., Douglass, C., Schüz, J., Craft, A.W., Savage, S.A., 2011. Height at diagnosis and birth-weight as risk factors for osteosarcoma. *Cancer Causes Control* 22, 899–908. <https://doi.org/10.1007/s10552-011-9763-2>
- Mirabello, L., Troisi, R.J., Savage, S.A., 2009. International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons. *Int. J. Cancer* 125, 229–234. <https://doi.org/10.1002/ijc.24320>
- Mirabello, L., Zhu, B., Koster, R., Karlins, E., Dean, M., Yeager, M., Gianferante, M., Spector, L.G., Morton, L.M., Karyadi, D., Robison, L.L., Armstrong, G.T., Bhatia, S., Song, L., Pankratz, N., Pinheiro, M., Gastier-Foster, J.M., Gorlick, R., de Toledo, S.R.C., Petrilli, A.S., Patino-Garcia, A., Lecanda, F., Gutierrez-Jimeno, M., Serra, M., Hattinger, C., Picci, P., Scotlandi, K., Flanagan, A.M., Tirabosco, R., Amary, M.F., Kurucu, N., Ilhan, I.E., Ballinger, M.L., Thomas, D.M., Barkauskas, D.A., Mejia-Baltodano, G., Valverde, P., Hicks, B.D., Zhu, B., Wang, M., Hutchinson, A.A., Tucker, M., Sampson, J., Landi, M.T., Freedman, N.D., Gapstur, S., Carter, B., Hoover, R.N., Chanock, S.J., Savage, S.A., 2020. Frequency of Pathogenic Germline Variants in Cancer-Susceptibility Genes in Patients With Osteosarcoma. *JAMA Oncol.* 6, 724–734. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.0197>
- Mrozek, E.M., Bajaj, V., Guo, Y., Malinowska, I.A., Zhang, J., Kwiatkowski, D.J., 2021. Identification of Hsp90 inhibitors as potential drugs for the treatment of TSC1/TSC2 deficient cancer. <https://doi.org/10.1101/2021.02.26.433022>
- Mutsaers, A.J., Walkley, C.R., 2014. Cells of origin in osteosarcoma: Mesenchymal stem cells or osteoblast committed cells? *Bone* 62, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.02.003>

- Nakanishi, A., Wada, Y., Kitagishi, Y., Matsuda, S., 2014. Link between PI3K/AKT/PTEN Pathway and NOX Proteinin Diseases. *Aging Dis.* 5, 203–211. <https://doi.org/10.14336/AD.2014.0500203>
- Narducci, M.G., Arcelli, D., Picchio, M.C., Lazzeri, C., Pagani, E., Sampogna, F., Scala, E., Fadda, P., Cristofolletti, C., Facchiano, A., Frontani, M., Monopoli, A., Ferracin, M., Negrini, M., Lombardo, G.A., Caprini, E., Russo, G., 2011. MicroRNA profiling reveals that miR-21, miR486 and miR-214 are upregulated and involved in cell survival in Sézary syndrome. *Cell Death Dis.* 2, e151–e151. <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.32>
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., Peng, C., 2018. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front. Endocrinol.* 9, 402. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>
- Okada, C., Yamashita, E., Lee, S.J., Shibata, S., Katahira, J., Nakagawa, A., Yoneda, Y., Tsukihara, T., 2009. A High-Resolution Structure of the Pre-microRNA Nuclear Export Machinery. *Science* 326, 1275–1279. <https://doi.org/10.1126/science.1178705>
- Papagelopoulos, P.J., Galanis, E.C., Vlastou, C., Nikiforidis, P.A., Vlamis, J.A., Boscainos, P.J., Fragiadakis, E.G., Stamos, K.G., Pantazopoulos, T., Sim, F.H., 2000. Current Concepts in the Evaluation and Treatment of Osteosarcoma. *Orthopedics* 23, 858–867. <https://doi.org/10.3928/0147-7447-20000801-11>
- Penna, E., Orso, F., Cimino, D., Tenaglia, E., Lembo, A., Quaglino, E., Poliseno, L., Haimovic, A., Osella-Abate, S., De Pittà, C., Pinatel, E., Stadler, M.B., Provero, P., Bernengo, M.G., Osman, I., Taverna, D., 2011. microRNA-214 contributes to melanoma tumour progression through suppression of TFAP2C. *EMBO J.* 30, 1990–2007. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.102>
- Penna, E., Orso, F., Cimino, D., Vercellino, I., Grassi, E., Quaglino, E., Turco, E., Taverna, D., 2013. miR-214 Coordinates Melanoma Progression by Upregulating ALCAM through TFAP2 and miR-148b Downmodulation. *Cancer Res.* 73, 4098–4111. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3686>
- Penna, E., Orso, F., Taverna, D., 2015. miR-214 as a Key Hub that Controls Cancer Networks: Small Player, Multiple Functions. *J. Invest. Dermatol.* 135, 960–969. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.479>
- Ratert, N., Meyer, H.-A., Jung, M., Lioudmer, P., Mollenkopf, H.-J., Wagner, I., Miller, K., Kilic, E., Erbersdobler, A., Weikert, S., Jung, K., 2013. miRNA Profiling Identifies

- Candidate miRNAs for Bladder Cancer Diagnosis and Clinical Outcome. *J. Mol. Diagn.* 15, 695–705. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2013.05.008>
- Ruby, J.G., Jan, C.H., Bartel, D.P., 2007. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 448, 83–86. <https://doi.org/10.1038/nature05983>
- Ruggieri, P., Mavrogenis, A.F., Pala, E., Romantini, M., Manfrini, M., Mercuri, M., 2013. Outcome of Expandable Prostheses in Children. *J. Pediatr. Orthop.* 33, 244. <https://doi.org/10.1097/BPO.0b013e318286c178>
- Sand, M., Skrygan, M., Sand, D., Georgas, D., Hahn, S.A., Gambichler, T., Altmeyer, P., Bechara, F.G., 2012. Expression of microRNAs in basal cell carcinoma. *Br. J. Dermatol.* 167, 847–855. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2012.11022.x>
- Scapoli, L., Palmieri, A., Muzio, L.L., Pezzetti, F., Rubini, C., Girardi, A., Farinella, F., Mazzotta, M., Carinci, F., 2010. MicroRNA Expression Profiling of Oral Carcinoma Identifies New Markers of Tumor Progression. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 23, 1229–1234. <https://doi.org/10.1177/039463201002300427>
- Sempere, L.F., Christensen, M., Silaharoglu, A., Bak, M., Heath, C.V., Schwartz, G., Wells, W., Kauppinen, S., Cole, C.N., 2007. Altered MicroRNA Expression Confined to Specific Epithelial Cell Subpopulations in Breast Cancer. *Cancer Res.* 67, 11612–11620. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5019>
- Sen, P., Ghosal, S., Hazra, R., Arega, S., Mohanty, R., Kulkarni, K.K., Budhwar, R., Ganguly, N., 2020. Transcriptomic analyses of gene expression by CRISPR knockout of miR-214 in cervical cancer cells. *Genomics* 112, 1490–1499. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.08.020>
- Shih, T.-C., Tien, Y.-J., Wen, C.-J., Yeh, T.-S., Yu, M.-C., Huang, C.-H., Lee, Y.-S., Yen, T.-C., Hsieh, S.-Y., 2012. MicroRNA-214 downregulation contributes to tumor angiogenesis by inducing secretion of the hepatoma-derived growth factor in human hepatoma. *J. Hepatol.* 57, 584–591. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.04.031>
- Smith, M.A., Gorlick, R., Kolb, E.A., Lock, R., Carol, H., Maris, J.M., Keir, S.T., Morton, C.L., Reynolds, C.P., Kang, M.H., Arts, J., Bashir, T., Janicot, M., Kurmasheva, R.T., Houghton, P.J., 2012. Initial testing of JNJ-26854165 (Serdemetan) by the pediatric preclinical testing program. *Pediatr. Blood Cancer* 59, 329–332. <https://doi.org/10.1002/pbc.23319>
- Song, Y.-D., Li, D.-D., Guan, Y., Wang, Y.-L., Zheng, J., 2017. miR-214 modulates cisplatin sensitivity of osteosarcoma cells through regulation of anaerobic glycolysis. *Cell. Mol. Biol. Noisy--Gd. Fr.* 63, 75–79. <https://doi.org/10.14715/cmb/2017.63.9.14>

- Sun, Y., Tang, L., Wu, C., Wang, J., Wang, C., 2023. RSK inhibitors as potential anticancer agents: Discovery, optimization, and challenges. *Eur. J. Med. Chem.* 251, 115229. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115229>
- Tang, N., Song, W.-X., Luo, J., Haydon, R.C., He, T.-C., 2008. Osteosarcoma Development and Stem Cell Differentiation. *Clin. Orthop.* 466, 2114–2130. <https://doi.org/10.1007/s11999-008-0335-z>
- Tanzer, A., Stadler, P.F., 2004. Molecular Evolution of a MicroRNA Cluster. *J. Mol. Biol.* 339, 327–335. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.03.065>
- Tate, R., Gerrand, C., Hale, J., 2015. Tibial turn-up procedure as an alternative to rotationplasty in a 4-year-old with osteosarcoma of the distal femur. *J. Pediatr. Orthop. B* 24, 50. <https://doi.org/10.1097/BPB.0000000000000110>
- The FANTOM Consortium, De Rie, D., Abugessaisa, I., Alam, T., Arner, E., Arner, P., Ashoor, H., Åström, G., Babina, M., Bertin, N., Burroughs, A.M., Carlisle, A.J., Daub, C.O., Detmar, M., Deviatiiarov, R., Fort, A., Gebhard, C., Goldowitz, D., Guhl, S., Ha, T.J., Harshbarger, J., Hasegawa, A., Hashimoto, K., Herlyn, M., Heutink, P., Hitchens, K.J., Hon, C.C., Huang, E., Ishizu, Y., Kai, C., Kasukawa, T., Klinken, P., Lassmann, T., Lecellier, C.-H., Lee, W., Lizio, M., Makeev, V., Mathelier, A., Medvedeva, Y.A., Mejhert, N., Mungall, C.J., Noma, S., Ohshima, M., Okada-Hatakeyama, M., Persson, H., Rizzu, P., Roudnický, F., Sætrom, P., Sato, H., Severin, J., Shin, J.W., Swoboda, R.K., Tarui, H., Toyoda, H., Vitting-Seerup, K., Winteringham, L., Yamaguchi, Y., Yasuzawa, K., Yoneda, M., Yumoto, N., Zabierowski, S., Zhang, P.G., Wells, C.A., Summers, K.M., Kawaji, H., Sandelin, A., Rehli, M., Hayashizaki, Y., Carninci, P., Forrest, A.R.R., De Hoon, M.J.L., 2017. An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. *Nat. Biotechnol.* 35, 872–878. <https://doi.org/10.1038/nbt.3947>
- Tian, Y., Zhang, Y.-Z., Chen, W., 2014. MicroRNA-199a-3p and microRNA-34a regulate apoptosis in human osteosarcoma cells. *Biosci. Rep.* 34, e00132. <https://doi.org/10.1042/BSR20140084>
- Tömböl, Z., Szabó, P.M., Molnár, V., Wiener, Z., Tölgyesi, G., Horányi, J., Riesz, P., Reismann, P., Patócs, A., Likó, I., Gaillard, R.-C., Falus, A., Rácz, K., Igaz, P., 2009. Integrative molecular bioinformatics study of human adrenocortical tumors: microRNA, tissue-specific target prediction, and pathway analysis. <https://doi.org/10.1677/ERC-09-0096>
- Ueda, T., Volinia, S., Okumura, H., Shimizu, M., Taccioli, C., Rossi, S., Alder, H., Liu, C., Oue, N., Yasui, W., Yoshida, K., Sasaki, H., Nomura, S., Seto, Y., Kaminishi, M.,

- Calin, G.A., Croce, C.M., 2010. Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis. *Lancet Oncol.* 11, 136–146. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70343-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70343-2)
- Vaksman, O., Stavnes, H.T., Kærn, J., Trope, C.G., Davidson, B., Reich, R., 2011. miRNA profiling along tumour progression in ovarian carcinoma. *J. Cell. Mol. Med.* 15, 1593–1602. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01148.x>
- Van Der Deen, M., Taipaleenmäki, H., Zhang, Y., Teplyuk, N.M., Gupta, A., Cinghu, S., Shogren, K., Maran, A., Yaszemski, M.J., Ling, L., Cool, S.M., Leong, D.T., Dierkes, C., Zustin, J., Salto-Tellez, M., Ito, Y., Bae, S.-C., Zielenska, M., Squire, J.A., Lian, J.B., Stein, J.L., Zambetti, G.P., Jones, S.N., Galindo, M., Hesse, E., Stein, G.S., Van Wijnen, A.J., 2013. MicroRNA-34c Inversely Couples the Biological Functions of the Runt-related Transcription Factor RUNX2 and the Tumor Suppressor p53 in Osteosarcoma. *J. Biol. Chem.* 288, 21307–21319. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.445890>
- Vlachos, A., Rosenberg, P.S., Atsidaftos, E., Alter, B.P., Lipton, J.M., 2012. Incidence of neoplasia in Diamond Blackfan anemia: a report from the Diamond Blackfan Anemia Registry. *Blood* 119, 3815–3819. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-375972>
- Volinia, S., Calin, G.A., Liu, C.-G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., Prueitt, R.L., Yanaihara, N., Lanza, G., Scarpa, A., Vecchione, A., Negrini, M., Harris, C.C., Croce, C.M., 2006. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2257–2261. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510565103>
- Wang, L.L., Gannavarapu, A., Kozinetz, C.A., Levy, M.L., Lewis, R.A., Chintagumpala, M.M., Ruiz-Maldonado, R., Contreras-Ruiz, J., Cunniff, C., Erickson, R.P., Lev, D., Rogers, M., Zackai, E.H., Plon, S.E., 2003. Association Between Osteosarcoma and Deleterious Mutations in the RECQL4 Gene in Rothmund-Thomson Syndrome. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 95, 669–674. <https://doi.org/10.1093/jnci/95.9.669>
- Wang, S., Cheng, H., Jiang, D., Huang, F., Su, S., Bai, H., 2014. Raman spectroscopy of coal component of Late Permian coals from Southern China. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 132, 767–770. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.06.003>
- Wang, Z., Cai, Haikang, Lin, L., Tang, M., Cai, Haiqing, 2014. Upregulated expression of microRNA-214 is linked to tumor progression and adverse prognosis in pediatric osteosarcoma. *Pediatr. Blood Cancer* 61, 206–210. <https://doi.org/10.1002/pbc.24763>

- Worley, L.A., Long, M.D., Onken, M.D., Harbour, J.W., 2008. Micro-RNAs associated with metastasis in uveal melanoma identified by multiplexed microarray profiling. *Melanoma Res.* 18, 184. <https://doi.org/10.1097/CMR.0b013e3282feeac6>
- Xie, M., Li, M., Vilborg, A., Lee, N., Shu, M.-D., Yartseva, V., Šestan, N., Steitz, J.A., 2013. Mammalian 5'-Capped MicroRNA Precursors that Generate a Single MicroRNA. *Cell* 155, 1568–1580. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.027>
- Xu, Z., Wang, T., 2014. miR-214 promotes the proliferation and invasion of osteosarcoma cells through direct suppression of LZTS1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 449, 190–195. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.04.140>
- Yamane, K., Jinnin, M., Etoh, T., Kobayashi, Y., Shimozone, N., Fukushima, S., Masuguchi, S., Maruo, K., Inoue, Y., Ishihara, T., Aoi, J., Oike, Y., Ihn, H., 2013. Down-regulation of miR-124/-214 in cutaneous squamous cell carcinoma mediates abnormal cell proliferation via the induction of ERK. *J. Mol. Med.* 91, 69–81. <https://doi.org/10.1007/s00109-012-0935-7>
- Yan, K., Gao, J., Yang, T., Ma, Q., Qiu, X., Fan, Q., Ma, B., 2012. MicroRNA-34a Inhibits the Proliferation and Metastasis of Osteosarcoma Cells Both In Vitro and In Vivo. *PLOS ONE* 7, e33778. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033778>
- Yanaihara, N., Caplen, N., Bowman, E., Seike, M., Kumamoto, K., Yi, M., Stephens, R.M., Okamoto, A., Yokota, J., Tanaka, T., Calin, G.A., Liu, C.-G., Croce, C.M., Harris, C.C., 2006. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 9, 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.01.025>
- Yang, H., Kong, W., He, L., Zhao, J.-J., O'Donnell, J.D., Wang, J., Wenham, R.M., Coppola, D., Kruk, P.A., Nicosia, S.V., Cheng, J.Q., 2008. MicroRNA Expression Profiling in Human Ovarian Cancer: miR-214 Induces Cell Survival and Cisplatin Resistance by Targeting PTEN. *Cancer Res.* 68, 425–433. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2488>
- Yang, J.-S., Maurin, T., Robine, N., Rasmussen, K.D., Jeffrey, K.L., Chandwani, R., Papapetrou, E.P., Sadelain, M., O'Carroll, D., Lai, E.C., 2010. Conserved vertebrate *mir-451* provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 15163–15168. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006432107>
- Yang, T.-S., Yang, X.-H., Wang, X.-D., Wang, Y.-L., Zhou, B., Song, Z.-S., 2013. MiR-214 regulate gastric cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting PTEN. *Cancer Cell Int.* 13, 68. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-13-68>

- Yang, Z., Chen, S., Luan, X., Li, Y., Liu, M., Li, X., Liu, T., Tang, H., 2009. MicroRNA-214 is aberrantly expressed in cervical cancers and inhibits the growth of HeLa cells. *IUBMB Life* 61, 1075–1082. <https://doi.org/10.1002/iub.252>
- Yoda, M., Kawamata, T., Paroo, Z., Ye, X., Iwasaki, S., Liu, Q., Tomari, Y., 2010. ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 17–23. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1733>
- Yu, Z., Zhong, L., Ji, T., Zhang, P., Chen, W., Zhang, C., 2010. MicroRNAs contribute to the chemoresistance of cisplatin in tongue squamous cell carcinoma lines. *Oral Oncol.* 46, 317–322. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2010.02.002>
- Zhang, J., Yan, Y.-G., Wang, C., Zhang, S.-J., Yu, X.-H., Wang, W.-J., 2015. MicroRNAs in osteosarcoma. *Clin. Chim. Acta* 444, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.01.025>
- Zhang, L., Huang, J., Yang, N., Greshock, J., Megraw, M.S., Giannakakis, A., Liang, S., Naylor, T.L., Barchetti, A., Ward, M.R., Yao, G., Medina, A., O'Brien-Jenkins, A., Katsaros, D., Hatzigeorgiou, A., Gimotty, P.A., Weber, B.L., Coukos, G., 2006. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 9136–9141. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508889103>
- Zhang, R., Su, B., 2009. Small but influential: the role of microRNAs on gene regulatory network and 3' UTR evolution. *Small Influ. Role MicroRNAs Gene Regul. Netw. 3cUTR Evol.* [https://doi.org/10.1016/S1673-8527\(09\)60001-1](https://doi.org/10.1016/S1673-8527(09)60001-1)
- Zhang, X., Liu, P., Zhang, B., Wang, A., Yang, M., 2010. Role of STAT3 decoy oligodeoxynucleotides on cell invasion and chemosensitivity in human epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Genet. Cytogenet.* 197, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2009.10.004>
- Zhang, Z.-C., Li, Y.-Y., Wang, H.-Y., Fu, S., Wang, X.-P., Zeng, M.-S., Zeng, Y.-X., Shao, J.-Y., 2014. Knockdown of miR-214 Promotes Apoptosis and Inhibits Cell Proliferation in Nasopharyngeal Carcinoma. *PLOS ONE* 9, e86149. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086149>
- Zhao, C., Xu, Y., Zhang, Yongqiang, Tan, W., Xue, J., Yang, Z., Zhang, You, Lu, Y., Hu, X., 2013. Downregulation of miR-145 contributes to lung adenocarcinoma cell growth to form brain metastases. *Oncol. Rep.* 30, 2027–2034. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2728>
- Zhao, G., Cai, C., Yang, T., Qiu, X., Liao, B., Li, W., Ji, Z., Zhao, J., Zhao, H., Guo, M., Ma, Q., Xiao, C., Fan, Q., Ma, B., 2013. MicroRNA-221 Induces Cell Survival and

- Cisplatin Resistance through PI3K/Akt Pathway in Human Osteosarcoma. PLOS ONE 8, e53906. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053906>
- Zhou, J., Huang, Z., Ni, X., Lv, C., 2020. Piperlongumine induces apoptosis and G2/M phase arrest in human osteosarcoma cells by regulating ROS/PI3K/Akt pathway. Toxicol. In Vitro 65, 104775. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104775>
- Zhou, Y., Lu, Q., Xu, Jifeng, Yan, R., Zhu, J., Xu, Juntao, Jiang, X., Li, J., Wu, F., 2017. The effect of pathological fractures on the prognosis of patients with osteosarcoma: a meta-analysis of 14 studies. Oncotarget 8, 73037–73049. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20375>
- Zhu, X.-B., Zhang, Z.-C., Han, G.-S., Han, J.-Z., Qiu, D.-P., 2017. Overexpression of miR-214 promotes the progression of human osteosarcoma by regulating the Wnt/ β -catenin signaling pathway. Mol. Med. Rep. 15, 1884–1892. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6203>