

PROGETTO DI RICERCA / RESEARCH PROJECT
(max 5 pagine / max 5 pages)

Cognome/Surname	Zichittella
Nome / Name	Chiara
Titolo del progetto / Project title	Studio del meccanismo molecolare attraverso cui gli RNA non codificanti (lncH19 e miR-675) controllano la resistenza alla terapia farmacologica nel carcinoma del colon-retto.
Corso di dottorato / PhD	ONCOLOGIA E CHIRURGIA SPERIMENTALI
Firma del candidato/ Applicant's signature	

Studio del meccanismo molecolare attraverso cui gli RNA non codificanti (lncH19 e miR-675) controllano la resistenza alla terapia farmacologica nel carcinoma del colon-retto.

1 - Sommario / Abstract

Il carcinoma del colon-retto (CRC) è il terzo tumore più frequentemente diagnosticato e il quarto in termini di decessi, con un numero crescente di pazienti che presenta recidiva e resistenza primaria o acquisita alla chemioterapia convenzionale.

Nei carcinomi, la proliferazione incontrollata delle cellule cancerose, determina all'interno della massa neoplastica una condizione di ipossia e la conseguente attivazione di pathway molecolari guidati dal fattore trascrizionale HIF-1 α ; numerosi studi dimostrano che la cellula tumorale, in risposta allo stimolo ipossico, cambia il suo fenotipo mettendo in atto molteplici strategie di sopravvivenza, non ultima la chemioresistenza. Pertanto risulta essenziale identificare i mediatori molecolari attraverso cui HIF controlla la progressione tumorale e la chemioresistenza, al fine di identificare nuovi e specifici target molecolari per il trattamento del carcinoma coloretale. Recenti studi associano la chemioresistenza ipossia-indotta ad un'attivazione della via autofagica, tuttavia i meccanismi molecolari sono ancora da definire.

Analisi preliminari da me condotte indicano che in condizioni ipossiche le cellule di carcinoma coloretale over-esprimono due non coding RNA, il lncH19 ed il suo miRNA intragenico miR-675. Inoltre, entrambi questi ncRNA ipossia-indotti sembrerebbero essere coinvolti sia nel processo di apoptosi che in quello autofagico, lasciando ipotizzare un loro ruolo nella resistenza al farmaco. L'obiettivo di questo progetto è quello di identificare, in modelli di carcinoma del colon, i meccanismi molecolari attraverso cui i ncRNA ipossia-indotti controllano l'autofagia, l'apoptosi ed infine la risposta al trattamento farmacologico, al fine di identificare nuovi target terapeutici per il trattamento del CRC.

2 - Descrizione del progetto / Project

Il carcinoma coloretale (CRC) è una delle più comuni neoplasie maligne dell'apparato gastrointestinale umano. Al mondo è il terzo tumore più frequentemente diagnosticato e il quarto in termini di decessi, pertanto è considerato una delle malattie più gravi che minaccia la salute umana [1,2].

Attualmente, sebbene siano stati immessi in commercio nuovi farmaci per pazienti con CRC, come gli anticorpi monoclonali cetuximab e panitumumab, secondo le principali linee guida per il trattamento del CRC, il chemioterapico standard è il 5-Fluorouracile (5-Fu), ampiamente utilizzato sia nella chemioterapia adiuvante che nella chemioterapia palliativa. Il 5-Fu è un antimetabolita analogo della pirimidina che inibisce la funzione dell'enzima timidilato sintasi, interrompendo la sintesi del nucleoside timidina e di conseguenza la replicazione del DNA e l'elaborazione dell'RNA [3].

Nonostante ciò, molteplici studi suggeriscono che sempre più pazienti con CRC mostrano una resistenza primaria o acquisita al 5-Fu, associata a prognosi sfavorevole. Proprio per questo motivo è cruciale la comprensione del meccanismo di resistenza al trattamento farmacologico [4].

Nei tumori solidi, la crescita incontrollata delle cellule tumorali, determina all'interno della massa tumorale una condizione di carenza di ossigeno e la conseguente attivazione di una complessa serie di vie molecolari guidate dal fattore trascrizionale HIF-1 α . Quest'ultimo, in condizioni ipossiche è libero di migrare nel nucleo dove insieme al fattore HIF1- β andrà ad attivare una serie di target genici determinando uno switch fenotipico della cellula tumorale indirizzandola verso un fenotipo più aggressivo. In risposta all'attivazione di HIF1- α la

cellula cambierà il suo metabolismo, promuoverà il richiamo di nuovi vasi, inizierà a rilasciare metalloproteasi e a degradare la matrice extracellulare mentre acquisirà un fenotipo più motile. Inoltre, l'attivazione della risposta ipossica è stata ampiamente associata ad una maggiore sopravvivenza delle "cellule tumorali iniziatrici" ed a chemioresistenza. Nonostante ciò i numerosi tentativi di inibire l'attività di HIF per il trattamento dei tumori solidi, non hanno prodotto i risultati attesi, probabilmente a causa della pleiotropicità del fattore trascrizionale [5]. Risulta quindi indispensabile identificare i mediatori molecolari attraverso cui HIF controlla la progressione tumorale e la chemioresistenza al fine di ottenere una terapia più efficace e mirata.

Studi recenti correlano la chemioresistenza ipossia-indotta ad un'attivazione della via autofagica, ma i meccanismi molecolari sono ancora da definire [6].

L'autofagia è un processo intracellulare di degradazione selettiva e riciclaggio dei componenti citoplasmatici danneggiati, essenziale per il mantenimento della biosintesi cellulare. Tale processo è altamente regolato dai geni ATG (Autophagy-Related Genes, originariamente identificati in lieviti) ed evolutivamente conservato [7]. L'autofagia si classifica prevalentemente in tre tipologie, denominate microautofagia, autofagia chaperon-mediata e macroautofagia, a seconda della modalità di ingresso del materiale citoplasmatico nel lume lisosomiale. La macroautofagia risulta essere la tipologia più diffusa, implica la formazione di vescicole definite autofagosomi, che inglobano all'interno le componenti cellulari da eliminare. Successivamente la membrana dell'autofagosoma si fonde con la membrana del lisosoma, formando i cosiddetti autolisosomi il cui contenuto esposto all'attività catalitica delle idrolasi lisosomiali viene trasportato nel citoplasma e riciclato, attraverso un pathway lisosoma-dipendente.

La macroautofagia è dunque suddivisa in tre fasi: l'iniziazione (il cui segnale nelle cellule di mammifero deriva dal sensore per i nutrienti mTOR), la formazione dell'autofagosoma (operata dalla chinasi PI3K di classe III e mediata da Beclin1, LC3II e complessi proteici ATG) e la maturazione-degradazione (attuata da proteine lisosomiali come LAMP1 e LAMP2) [8]. Nonostante l'elevato numero di pubblicazioni degli ultimi anni relative al coinvolgimento dei processi autofagici in fisiologia e patologia, il ruolo dell'autofagia nell'insorgenza e progressione del cancro è ancora controverso. Se da una parte infatti l'autofagia rientra tra i meccanismi di difesa dall'insorgenza tumorale, prevenendo lo stress ossidativo e l'instabilità genetica, dall'altra consente alle cellule tumorali, negli stadi più avanzati del tumore, di tollerare condizioni di stress metabolico, terapeutico-farmacologico o ipossico [9,10]. Sebbene quindi inibitori dell'autofagia sembrerebbero migliorare l'efficacia del trattamento chemioterapico in alcuni tumori [11-13], tale strategia terapeutica potrebbe rivelarsi come un'arma a doppio taglio per il trattamento di tumori, come quello del colon-retto, soggetto a chemioresistenza ma anche a recidiva.

Una chiave di lettura più completa del processo potrebbe essere fornita dallo studio del ruolo svolto dagli RNA non codificanti durante il processo di trasformazione neoplastica, progressione tumorale e chemioresistenza.

È noto che il 98% del trascrittoma umano codifica per diverse classi di RNA non codificanti (ncRNA), la cui importanza biologica viene gradualmente riconosciuta, soprattutto in condizioni ipossiche in diversi tipi di tumori [14,15]. I ncRNA sono espressi in modo aberrante nel cancro e sono coinvolti in molteplici processi biologici come proliferazione, differenziazione, apoptosi e progressione tumorale. Essi sono genericamente classificati in base alle loro dimensioni, distinguiamo infatti: i piccoli RNA non codificanti (dimensione < 200 nucleotidi, come i microRNA) ed i long non coding RNA (lncRNA, dimensione > 200 nucleotidi). I microRNA (miRNA) sono una classe di piccoli RNA endogeni a singolo filamento, che legandosi alla regione 3'-non tradotta (3'-UTR) degli RNA messaggeri target (mRNA), possono regolarne negativamente l'espressione e svolgere ruoli chiave nella differenziazione cellulare, proliferazione, apoptosi, angiogenesi e risposte allo stress metabolico [16, 17].

I lncRNA, invece sono dei ncRNA che svolgono ruoli cruciali nella regolazione dell'espressione genica a più livelli, tra cui quello epigenetico (nel silenziamento del cromosoma X, "genomic imprinting" e modifiche della cromatina) [18], quello trascrizionale (attivazione o inattivazione della trascrizione) [19] e anche quello post-trascrizionale (splicing, turnover dell'mRNA, traduzione e "RNA interference") [20], attraverso l'interazione con altre molecole, tra cui proteine, regioni regolatorie del DNA e miRNA.

Essi sono in grado di svolgere diverse funzioni tra cui, quella di guida, scaffolds, inibizione competitiva di altri RNA e precursori di miRNA [21]. Sono ulteriormente coinvolti nella carcinogenesi, in particolare in quella del CRC, la loro espressione risulta essere deregolata in associazione a metastasi, recidiva, prognosi e chemioresistenza. Attualmente, è noto che i lncRNA mediano la chemioresistenza principalmente attraverso i seguenti meccanismi: limitazione dell'accumulo di farmaco all'interno delle cellule, aumento della riparazione del danno al DNA, modifica della progressione del ciclo cellulare e dei checkpoints, regolazione delle vie di segnalazione cellulare, promozione della transizione epiteliale-mesenchimale (EMT) e resistenza all'apoptosi [22].

Negli ultimi decenni, prove crescenti evidenziano che i ncRNA, mediano la regolazione trascrizionale e post-trascrizionale dei geni correlati all'autofagia partecipando a networks autofagici. L'espressione differenziale dei ncRNA influenza i livelli di autofagia in diversi stadi fisiologici e patologici, tra cui la proliferazione-differenziazione embrionali, la senescenza cellulare e le malattie come il cancro [23]. È stato confermato che i miRNA svolgono ruoli regolatori e prendono parte a tutte le fasi dell'autofagia, dall'iniziazione, nucleazione ed espansione dell'autofagosoma, fino alla maturazione-degradazione dell'autolisosoma [24]. Inoltre sono stati osservati profili di espressioni di miRNA significativamente alterati, up-regolati o down-regolati, in cellule CRC resistenti al 5-Fu [22].

Dopo il conseguimento della laurea mi sono dedicata allo studio degli RNA non codificanti che, attivati da HIF-1 svolgono il ruolo di mediatori molecolari nella risposta ipossica, al fine di identificare nuovi e più mirati target terapeutici. Studi recenti hanno dimostrato che il long non coding H19, da solo o attraverso l'espressione del miRNA intragenico miR-675, è in grado di controllare alcune delle modifiche fenotipiche indotte dall'ipossia come la stimolazione della neoangiogenesi, la promozione di transizioni epitelio mesenchima associate alla progressione tumorale [25,26] ed il controllo del ciclo cellulare [27].

Sebbene molteplici lavori mostrino un coinvolgimento del lncH19 nei processi autofagici, il suo ruolo come attivante o inibente il processo stesso sembra essere strettamente condizionato dal tipo di tumore o dallo stadio dello stesso [28,29].

Al fine di investigare il ruolo del lncH19 e del miR-675 nel processo di chemioresistenza nei diversi stadi del carcinoma colorettales mi sono servita di un modello isogenico di linee cellulari, le SW480 e SW620. Queste sono linee isolate da uno stesso paziente, rispettivamente dal tumore primario e dal sito linfonodale di metastasi. Dati preliminari hanno confermato che entrambe le linee poste in condizioni di ipossia cronica presentano chemioresistenza in seguito a trattamento con Doxorubicina (Doxo) e 5-Fu (**Figura 1**).

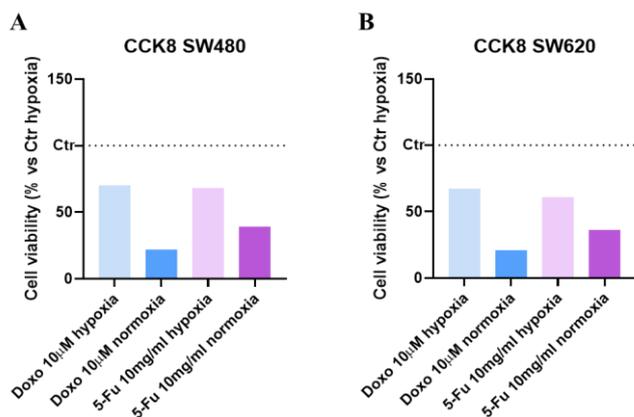


Figura 1: In condizioni ipossiche le cellule di CRC sviluppano chemioresistenza. Saggio di vitalità cellulare Cell Counting Kit-8 in SW480 (A) e SW620 (B) sottoposte per 72h a trattamento con chemioterapici (10 µM di doxorubicina e 10µM di 5-Fu) in condizioni normossiche ed ipossiche.

Una analisi dei livelli di espressione dei non coding RNA in condizioni di ipossia cronica ha rivelato in entrambi i modelli cellulari un incremento dell'espressione sia del miR-675 che del lncH19. Inoltre un loro silenziamento sembra indurre un ripristino della resistenza al farmaco. Indicando un coinvolgimento diretto degli stessi nel processo di chemioresistenza.

Analisi preliminari svolte per identificare il meccanismo attraverso cui i non coding RNA possano favorire la chemioresistenza hanno dimostrato un coinvolgimento di entrambi sia nei processi apoptotici che autofagici. La rimozione di entrambi in condizioni ipossiche induce infatti una attivazione sia dell'apoptosi (**Figura 2**), che dell'autofagia (**Figura 3**), ma con intensità diversa in relazione al non coding RNA silenziato e allo stadio tumorale.

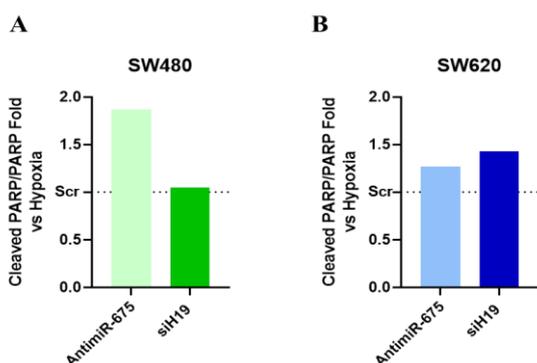


Figura 2: Effetti indotti dall'inibizione di miR-675 e dal silenziamento del lncH19 sui livelli proteici del marker apoptotico PARP. Analisi densitometriche del Western Blot condotto sui lisati proteici totali di cellule SW480 (A) e SW620 (B) in ipossia transfettate con AntimiR-675, siH19 e Scrambled negative control (Scr), normalizzati rispetto alla condizione di Scr. I risultati di PARP sono rappresentati in termini di rapporto fra la forma clivata della proteina e quella intera (Cleaved PARP/PARP).

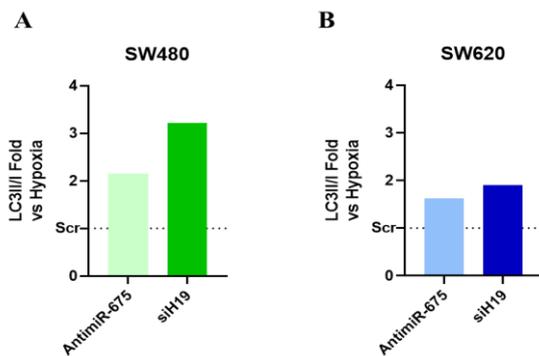


Figura 3: Effetti indotti dall'inibizione di miR-675-5p e dal silenziamento del lncH19 sui livelli proteici del marker autofagico LC3. Analisi densitometriche del Western Blot condotto sui lisati proteici totali di cellule SW480 (A) e SW620 (B) in ipossia transfettate con AntimiR-675, siH19 e Scrambled negative control (Scr), normalizzati rispetto alla condizione di Scr. I risultati di LC3 sono rappresentati in termini di rapporto fra la forma clivata della proteina e quella intera (LC3II/I).

Sebbene i dati indicati siano soltanto dei dati preliminari, questi sono coerenti nell'indicare un ruolo dei non coding RNA ipossia-indotti nel processo di chemioresistenza.

Lo scopo del progetto è quello di identificare in dettaglio i meccanismi molecolari attraverso cui i non coding RNA ipossia-indotti (lncRNA H19 ed il suo miRNA intragenico miR-675) controllano la risposta ai farmaci, l'autofagia e l'apoptosi in modelli di carcinoma del colon, al fine di identificare nuovi e più efficaci target molecolari per il trattamento del carcinoma coloretale.

Nello specifico lo scopo delle attività sperimentali di seguito descritte sarà quello di:

- 1) correlare l'espressione dei non coding RNA (lncH19 e miR-675) alla chemioresistenza nel carcinoma del colon-retto.
- 2) investigare i meccanismi molecolari attraverso cui il lncRNA e i miRNA controllano, chemioresistenza, l'autofagia e la risposta agli stimoli apoptotici.
- 3) testare il potenziale terapeutico degli inibitori dei ncRNA in vitro e in vivo, da soli o combinati alla terapia convenzionale.

Strategie:

1) Attraverso Saggi di vitalità cellulare (MTT Assay e Cell Counting Kit-8) su linee cellulari di CRC, andremo a valutare la sensibilità al trattamento con chemioterapici (es. 5-Fu, Doxo ed altri chemioterapici in uso come capecitabina, oxaliplatino, irinotecan, panitumumab e/o cetuximab) sia in condizioni ipossiche che in normossia. In aggiunta andremo a valutare lo stress ossidativo indotto dal farmaco mediante l'analisi dei ROS (specie reattive dell'ossigeno) e dei livelli di glutatione ridotto rispetto a quelli di glutatione ossidato (mediante ROS-Glo™ H₂O₂ Assay, GSH/GSSG-Glo™ Assay), in quanto un cambiamento nei livelli di ROS, GSH e GSSG in seguito a trattamento farmacologico è indice di stress ossidativo, che potenzialmente potrebbe indurre apoptosi.

Inoltre al fine di indentificare i meccanismi associati alla chemioresistenza, nei campioni sopra indicati verranno analizzati anche i livelli di espressione genica (mediante Rea-Time PCR) e proteica (mediante Western Blot) di geni e proteine coinvolti nel processo autofagico (tra cui Beclin1, LC3, ATG) e apoptotico (come le proteine pro ed anti apoptotiche es. BAX, BAD, BCL2, Caspasi 3, PARP).

Mediante analisi trascrizionale andremo quindi a valutare i livelli di espressione del lncH19 e del miRNA-675 nelle diverse condizioni sperimentali, al fine di identificare eventuali correlazioni tra l'espressione dei non coding RNA e la risposta al trattamento farmacologico, correlazione ad oggi non nota.

In contemporanea uno studio valutativo verrà effettuato su biopsie di soggetti resistenti e sensibili alla terapia convenzionale al fine di identificare in vivo possibili correlazioni tra l'espressione dei non coding RNA di interesse e la risposta alla terapia convenzionale.

I dati ottenuti verranno quindi confrontati con quanto presente nei database di profili di espressione genica nei soggetti affetti da carcinoma (es. Cancer Genome Atlas, cBioPortal for Cancer Genomics).

2) Sulla base dei dati preliminari ottenuti in laboratorio e dei dati presenti in letteratura che associano l'espressione del lncRNA all'autofagia, andremo ad analizzare la piattaforma molecolare attraverso cui il lncH19 e/o il miR-675 potrebbero controllare il processo di chemioresistenza e l'autofagia, al fine di identificare nuovi e più specifici target terapeutici.

Per quanto concerne il lncH19, considerando il suo ruolo di modulatore epigenetico a livello nucleare si andrà ad effettuare un'analisi delle modifiche dello stato della cromatina, ovvero delle alterazioni epigenetiche sui promotori di geni implicati nell'autofagia e che da analisi bioinformatica risultino essere possibili target del lncH19.

Mediante opportuni kit (ad es. il DNA Methylation Kit), sarà possibile valutare lo stato di metilazione dei geni di interesse nelle varie condizioni sperimentali. Sia su linee cellulari di CRC sensibili e resistenti ai chemioterapici, che su cellule di pazienti, silenziate o meno per il lncH19.

Inoltre, considerato il ruolo dei lncRNA come scaffold per complessi multiproteici, nelle diverse condizioni, normossia, ipossia e su biopsie da pazienti sensibili o resistenti alla terapia convenzionale, sarà eseguito l'RNA pull-down del lncH19 e successive indagini proteomiche (spettrometria di massa) al fine di identificare interattori del lncH19, sia a livello nucleare che citoplasmatico. Infatti un'analisi analitica tramite spettrometria di massa su complessi precipitati con lncH19 potrebbe permetterci di identificare come variano i fattori associati al lncRNA in condizioni ipossiche e normossiche ed in soggetti sensibili e resistenti alla terapia convenzionale.

Per investigare il ruolo del miR-675 in primo luogo tramite analisi bioinformatica, andremo a ricercare se tra i suoi target, putativi o validati, sono presenti geni coinvolti nel processo autofagico o nella resistenza a farmaco. Successivamente linee cellulari di CRC e cellule di paziente verranno o meno trattate con miR-675 per valutare come il profilo trascrizionale e la risposta al trattamento farmacologico varia in funzione del microRNA.

3) Al fine di testare l'efficacia terapeutica degli inibitori dei ncRNA (anti miR-675 o silncH19) in vitro e in vivo, verranno generati modelli murini di tumore del colon attraverso l'inoculo nella parete del ceco di cellule sensibili e resistenti ai chemioterapici geneticamente ingegnerizzate per l'espressione della luciferasi. Saranno effettuati trattamenti da soli o in concomitanza ai farmaci. Inoltre attraverso metodiche di Live imaging si potrà monitorare l'andamento del tumore, e all'end point gli organi verranno prelevati ed analizzati per valutare l'espressione genica e proteica dei target identificati in vitro.

3 - Bibliografia / References

- [1] Arnold, M., et al Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. **2017**; 66, 683–691.
- [2] Rebecca L., Siegel, Kimberly D. Miller, Ahmedin Jemal. *Cancer Statistics 2017*, CA Cancer J Clin. **2017**; 67(1):7-30.
- [3] Jia Che, et al., Phosphorylase Expression and Prognosis in Colorectal Cancer Treated With 5-fluorouracil-based Chemotherapy: A Meta-Analysis. *Mol Clin Oncol*. **2017**; 7(6):943-952.
- [4] K. Van der Jeught et al. Drug resistance and new therapies in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. **2018**; 24(34): 3834–3848.
- [5] Jaleh Fallah, Brian I Rini. HIF Inhibitors: Status of Current Clinical Development. *Curr Oncol Rep*. **2019**; 21(1):6.
- [6] Wei Zhang et al. LncRNA CPS1-IT1 Suppresses EMT and Metastasis of Colorectal Cancer by Inhibiting Hypoxia-Induced Autophagy Through Inactivation of HIF-1 α . *Biochimie* **2018**, 144:21-27.
- [7] Christopher A L. et al. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2013**; 14(12):759-74.
- [8] Lorenzo Galluzzi et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. Published online **2015**.
- [9] Eileen White et al. The Double-edged Sword of Autophagy Modulation in Cancer. *Clin Cancer Res*. **2009**; 15(17): 5308–5316.
- [10] Eskelinen EL. The dual role of autophagy in cancer. *Curr Opin Pharmacol*. **2011**; 11(4):294-300.
- [11] Fen Liu et al. LncRNA NEAT1 knockdown attenuates autophagy to elevate 5-FU sensitivity in colorectal cancer via targeting miR-34a. *Cancer Med*. **2020**; 9(3):1079-1091.
- [12] Etienne Morel et al. Autophagy: A druggable process. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. **2017**; 57:375–398.
- [13] Licheng Jiang et al. Inhibition of autophagy augments chemotherapy in human salivary adenoid cystic carcinoma. *J Oral Pathol Med*. **2014**; 43(4):265-72.
- [14] Sarah Djebali et al. Landscape of transcription in human cells. *Nature*. **2012**; 489(7414):101-8.
- [15] Hui Ling et al. MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nat Rev Drug Discov*. **2013**; 12(1):847-65.
- [16] G.S. Markopoulos, et al. A step-by-step microRNA guide to cancer development and metastasis. *Cell. Oncol*. **2017**; 40,303–339.
- [17] S. Ebrahimi, S.I. Hashemy, MicroRNA-mediated redox regulation modulates therapy resistance in cancer cells: Clinical perspectives. *Cell. Oncol*. **2019**; 42, 131–141.
- [18] Joseph M Autuoro et al. Long noncoding RNAs in imprinting and X chromosome inactivation. *Biomolecules*. **2014**; 4(1):76-100.
- [19] Aleksandra E Kornienko et al. Gene regulation by the act of long non-coding RNA transcription. *BMC Biol*. **2013**; 11:59.
- [20] Je-Hyun Yoon et al. Posttranscriptional gene regulation by long noncoding RNA. *J Mol Biol*. **2013**; 425(19):3723-30.
- [21] Julien Jarroux et al. History, Discovery, and Classification of lncRNAs. *Adv Exp Med Biol*. **2017**; 1008:1-46.
- [22] Ling Wei et al. The emerging role of noncoding RNAs in colorectal cancer chemoresistance. *Cell Oncol*. **2019**; 42(6):757-768.
- [23] Shashi Kumar Gupta et al. Non-coding RNAs as orchestrators of autophagic processes. *J Mol Cell Cardiol*. **2016**; 95:26-30.
- [24] Jian Zhang et al. The emergence of noncoding RNAs as Heracles in autophagy. *Autophagy*. **2017**; 13(6): 1004–1024.
- [25] Lo Dico A., Costa V., Martelli C., Diceglie C., Rajata F., Rizzo A., Mancone C., Tripodi M., Ottobrini L., Alessandro R. MiR675-5p Acts on HIF-1 α to Sustain Hypoxic Responses: A New Therapeutic Strategy for Glioma. *Theranostics*. **2016**; 6, 1105–1118.
- [26] Costa, V.; Lo Dico, A.; Rizzo, A.; Rajata, F.; Tripodi, M.; Alessandro, R.; Conigliaro, A. MiR-675-5p supports hypoxia induced epithelial to mesenchymal transition in colon cancer cells. *Oncotarget* **2017**; 8,24292–24302.
- [27] Laura Saieva, Maria Magdalena Barreca, Chiara Zichitella, Maria Giulia Prado, Marco Tripodi, Riccardo Alessandro and Alice Conigliaro. Hypoxia-Induced miR-675-5p Supports β -Catenin Nuclear Localization by Regulating GSK3- β Activity in Colorectal Cancer Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**; 21(11): E3832.
- [28] Ji Wang et al. The long noncoding RNA H19 promotes tamoxifen resistance in breast cancer via autophagy. *J Hematol Oncol*. **2019**; 12(1):81.
- [29] Meng Wang et al. Long non-coding RNA H19 confers 5-Fu resistance in colorectal cancer by promoting SIRT1-mediated autophagy. *Cell Death Dis*. **2018**; 9(12):1149.