

RUOLO DELLA TRASCRIPTASI INVERSA CODIFICATA DA RETROTRANSPOSONI NELLA GENESI E PROGRESSIONE DEI TUMORI UMANI

Ilaria Sciamanna, Patrizia Vitullo, Corrado Spadafora
 Servizio Biologico e per la Gestione della Sperimentazione Animale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Complessità del genoma tumorale

Storicamente, il concetto che il genoma svolga un ruolo centrale nello sviluppo del cancro è stato proposto fin dall'inizio del 20° secolo, quando Boveri identificò le alterazioni cromosomiche come fenomeno caratteristico delle cellule tumorali. Quell'ipotesi è stata progressivamente consolidata dalle scoperte che il DNA rappresenta la base chimica dell'eredità (1), che agenti genotossici causano il cancro (2), che le aberrazioni cromosomiche correlano con i tumori ematologici (3) e più recentemente con le scoperte degli oncogeni (4) e dei geni *tumour suppressor* (5). Su queste basi è fondata l'idea che il cancro sia la conseguenza dell'accumulo sequenziale di mutazioni nel DNA di geni rilevanti. Coerentemente con questa ipotesi, uno degli obiettivi principali della ricerca oncologica attuale è l'identificazione di mutazioni ricorrenti, ritenuti tipici marcatori genetici tumorali (6).

Recenti progressi tecnologici, (7, 8) hanno potenziato la capacità di identificare alterazioni nel DNA delle cellule tumorali con lo scopo di realizzare un catalogo di tutte le mutazioni *driver* del DNA somatico capaci di conferire un vantaggio selettivo di crescita e facilitare l'espansione clonale delle cellule tumorali, in contrasto alle mutazioni *passenger* neutrali (9, 6). Le mutazioni *driver*, e i geni *target* alterati da queste mutazioni, sono i parametri identificativi del genoma tumorale, permissivo per la genesi, la crescita e la propagazione del cancro.

Tuttavia, malgrado l'enorme mole di risultati prodotti e l'ampio screening effettuato, le mutazioni ricorrenti non sono state trovate, se non in pochi e specifici casi (10-12) nei genomi tumorali mentre è emerso che essi sono caratterizzati da un alto background di mutazioni eterogenee (13, 14).

Questi studi hanno influenzato gli indirizzi dell'oncologia clinica e l'approccio terapeutico al cancro favorendo l'attuale tendenza a caratterizzare i profili genetici di tumori individuali e a identificare nuove mutazioni a livello del singolo paziente con l'intento di definire terapie personalizzate (15). Questi studi, se da un lato hanno contribuito ad espandere le conoscenze sulla genetica del cancro, dall'altro hanno sollevato più quesiti che fornito risposte. Un quesito è come l'assenza di mutazioni *driver* "universali" nei tumori possa giustificare un'ipotesi unificante sulla genesi e progressione del cancro. Un'altra questione è l'impossibilità di conciliare i ricorrenti *pattern* biologici e clinici che caratterizzano tutti i tumori (proliferazione incontrollata, perdita del differenziamento, perdita dell'inibizione di contatto, invasività) con l'estrema eterogeneità delle mutazioni rilevata nei tumori.

La maggior parte degli studi effettuati sono stati focalizzati sulla porzione di appena 1,2% del genoma umano che contiene i geni codificanti (16), mentre la porzione non codificante, che costituisce la maggioranza del genoma e presumibilmente accoglie un più alto numero di mutazioni, è stata esclusa in quanto considerata DNA "spazzatura" (*junk DNA*) (17, 18).

Recentemente, tuttavia, il *junk DNA* è stato riabilitato da nuovi studi che hanno rivelato i meccanismi di regolazione globale dei piccoli RNA (19), dell'RNA *non-coding* (ncRNAs) (20, 21), delle regioni altamente conservate (UCRs) (22, 23) e dei retroelementi (24, 25), rivoluzionando le ipotesi sul controllo delle funzioni genomiche e rivelando inattese implicazioni nella tumorigenesi (26-29).

In questo contesto, i nostri studi hanno rivelato che un'attività di RT endogena codificata dai retrotrasposoni LINE-1 gioca un ruolo chiave nel processo di perdita di differenziamento e nella progressione tumorale. Questo lavoro è derivato dalle nostre precedenti osservazioni che gli spermatozoi e gli embrioni precoci sono dotati di un'attività RT endogena che è essenziale per lo sviluppo embrionale.

Quello che segue è l'esposizione dei nostri studi sui ruoli funzionali svolti da RT nei genomi dei gameti, embrioni e tumori.

RT codificata da retrotrasposoni in spermatozoi, embrioni precoci e cellule tumorali

I geni codificanti RT sono ospitati nelle due grandi famiglie di retroelementi LINE-1 e HERV che, insieme alle altre famiglie non autonome Alu/SINE e SVA, costituiscono il 45% del genoma umano (16, 30). L'enzima RT assolve un ruolo operativo fondamentale nell'amplificazione dei singoli retroelementi consentendone l'accumulo nel corso dell'evoluzione e non è mai stata considerata candidata potenziale per altre funzioni cellulari.

La nostra inaspettata scoperta che gli spermatozoi di topo sono dotati di un'attività RT endogena (31) ha sollevato il dubbio su un suo possibile ruolo nello sviluppo embrionale. Abbiamo trovato che anche gli embrioni murini di 1, 2 e 4 cellule contengono una RT endogena funzionalmente attiva (32) e che la sua inibizione, utilizzando l'inibitore RT non-nucleosidico nevirapine (32) o per silenziamento dell'espressione dei geni codificanti RT (33), causa un drastico e irreversibile arresto dello sviluppo agli stadi di 2-4 cellule. L'RT embrionale, codificata dalla famiglia di retrotrasposoni LINE-1 (34), emerge pertanto come una componente essenziale dello sviluppo embrionale preimpianto.

È un concetto elaborato fin dalla metà del 19° secolo che l'embriogenesi e la tumorigenesi condividono caratteristiche funzionali comuni (35) e che il processo tumorale riflette la riattivazione di programmi embrionali (36). In questa prospettiva, ci è sembrato importante stabilire se anche le cellule tumorali fossero dotate di un'attività RT. Abbiamo trovato che, indipendentemente dal tipo o dall'origine istologica dei tumori, le numerose linee tumorali analizzate contenevano elevati livelli di attività RT (37) e che la nevirapina ne riduceva drasticamente la capacità di retrotrascrizione dimostrando che RT tumorale è sensibile agli inibitori RT. Quest'ultima osservazione ci ha offerto uno strumento utile per studiare il ruolo dell'RT nella genesi e progressione dei tumori umani.

La RT ha un ruolo causativo nella tumorigenesi

L'esposizione di linee cellulari tumorali a due inibitori farmacologici di RT, nevirapina e efavirenz (38), inducono tre effetti principali:

- rallentamento della frequenza di proliferazione;
- induzione del differenziamento cellulare;
- riprogrammazione globale dell'espressione genica;

Queste caratteristiche, indotte dopo pochi giorni di esposizione, sono comuni a linee e tipi tumorali di differenti origini istologiche (37).

Le diverse linee cellulari tumorali sulle quali abbiamo condotto studi più approfonditi sono riassunte in Tabella 1: l'inibizione di RT stimola il loro differenziamento ripristinando l'espressione di *marker* di differenziamento.

Tabella 1. Differenziamento di linee cellulari umane tumorali indotto da inibitori RT

Linea cellulare	Tipo tumorale	Markers di differenziamento	Referenze
NB40, HL60	leucemia acuta promielocitica	CD15 marker mieloido, test NBT ^a	(37)
HL60	leucemia acuta mielocitica	CD15 marker mieloido, test NBT	(37)
A-375	melanoma	E-caderina	(39)
PC3	carcinoma prostatico	PS-A, recettore androgeni	(39)
ARO, FRO	carcinoma tiroideo anaplastico	tiroglobulina, recettore tiroglobulina	(87)

a. Nitroblue tetrazolium (NBT) test riduzione colorimetrica

L'analisi dei profili di espressione genica da cellule A-375 prima e dopo l'esposizione agli inibitori RT ha dimostrato che la riprogrammazione è un fenomeno globale che coinvolge tre ampie classi di trascritti nucleari: mRNA che codificano per proteine, micro RNA (miRNAs) e RNA trascritti da sequenze ultraconservate (UCRs) (Sciamanna e Spadafora, in preparazione). È rilevante che tutti gli effetti osservati - ridotta proliferazione, cambiamenti morfologici, induzione dell'espressione di *marker* e riprogrammazione dell'espressione genica - sono reversibili in seguito alla sospensione del trattamento con inibitori RT (39) suggerendo che la modulazione RT-dipendente funziona su una base epigenetica.

Queste osservazioni hanno aperto la prospettiva pratica di utilizzare l'inibizione di RT in una terapia anti-cancro. Per validare questa idea, cellule tumorali umane (A-375, PC3, H69 microcitoma e HT29 carcinoma del colon) sono state inoculate in topi nudi poi trattati con una dose giornaliera di efavirenz. Coerentemente con i risultati ottenuti *in vitro*, l'inibizione di RT antagonizza la progressione di tutti i tipi tumorali (39) che tuttavia riprende in seguito alla sospensione del trattamento, confermando la natura epigenetica del meccanismo RT-dipendente.

Per dimostrare in modo non ambiguo che l'efficacia anti tumorale è effettivamente dovuta all'inibizione di RT abbiamo silenziato nelle cellule A-375 l'espressione di una famiglia LINE-1, altamente attiva nell'uomo (40), via RNA interference (RNAi) (39, 41). Questo approccio ha indotto alterazioni fenotipiche nelle cellule di melanoma, simili a quelle indotte dagli inibitori farmacologici di RT, cioè una ridotta proliferazione e un differenziamento morfologico. Inoltre, l'interferenza LINE-1-specifica riduce drasticamente il potenziale tumorigenico delle cellule di melanoma inoculate nei topi nudi (41). Questi risultati confermano il ruolo causativo dell'RT da LINE-1 nella genesi e progressione tumorale. I risultati di questi studi sono pertanto consistenti con l'ipotesi che l'attivazione dei retrotrasposoni sia un evento precocemente correlato alla tumorigenesi.

Tra i meccanismi di riattivazione dei retroelementi, lo stress cellulare svolge un ruolo predominante in quanto i retrotrasposoni sono sequenze di DNA sensibili ai cambiamenti ambientali. Una mole crescente di dati conferma il coinvolgimento degli stress ambientali - ossidativi, genotossici, raggi UV, radiazioni ionizzanti, idrocarburi, infezioni e ferite - nella modulazione degli RNA *non-coding*, nella metilazione del DNA, nelle modificazioni degli istoni e nella riorganizzazione della cromatina - tutti eventi con effetti globali sulle funzioni e il destino della cellula (42, 43). I segnali di stress possono pertanto indurre risposte globali che complessivamente promuovono l'attivazione dei retroelementi (44-46) i quali, a loro volta, modulano il trascrittoma (47-49). In questo contesto, l'interferenza trascrizionale è un ben noto esempio di controllo epigenetico dell'espressione genica (50) che consiste nell'effetto inibitorio esercitato dall'espressione di retroelementi su quella dei geni vicini. Il gene murino *agouti* è un

tipico caso: l'espressione di questo locus è modulato da un elemento retrotrasposonico IAP (*intracisternal A particle*) piazzato 100 kb a monte. Quando l'elemento IAP è silente, il locus *agouti* è espresso, mentre quando IAP è attivo l'espressione di *agouti* è abrogata o ridotta proporzionalmente. L'attività retrotrasposonica modula anche processi di silenziamento su larga scala, come accade nell'inattivazione del cromosoma X nelle cellule femminili (51). I retroelementi pertanto possono essere visti come "reostati molecolari", ossia sensori capaci di captare gli stimoli ambientali e di modulare in risposta i profili di espressione genica, variando in questo modo le caratteristiche e il destino della cellula e determinando l'emergere di fenotipi alterati e patologici.

La capacità dei retrotrasposoni di produrre una risposta genica a stimoli esterni rende la loro mobilitazione una continua minaccia mutagenica per il genoma. In termini evolutivi, le cellule hanno sviluppato numerosi meccanismi repressivi finalizzati a contenere o abrogare la loro mobilità e a minimizzarne i potenziali effetti distruttivi (52, 53). Tra questi, l'ipermetilazione del DNA, che è stato il primo meccanismo di repressione dell'attività dei retroelementi ad essere scoperto (54) e le mutazioni via deaminazione della citosina (*C to U transition*) mediate da membri della famiglia APOBEC (*apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide 3*, APOBEC3) (55-57) esercitano un effetto repressivo su un ampio spettro di elementi durante il ciclo di retrotrasposizione. Un ulteriore livello di controllo della retrotrasposizione è mediato dal meccanismo di RNA interference (RNAi) che inoltre controlla anche la metilazione del DNA dei retroelementi e la formazione di eterocromatina (53). RNAi può regolare l'espressione anche a livello post-transcriptionale degradando gli mRNA utilizzando *small interfering RNA* (siRNA) naturali originati da trascritti bidirezionali senso/antisense dell'estremità 5' di LINE-1 (58).

La necessità biologica della retrotrasposizione nel corso dell'embriogenesi, da un lato, e i suoi effetti potenzialmente distruttivi dall'altro, sono aspetti contrapposti ma ben regolati dai meccanismi repressivi in contesti biologici fisiologicamente modulati: (i) fisiologicamente, non sono attivi nell'embriogenesi precoce, (ii) sono in piena attività nei normali tessuti somatici, e (iii) sono funzionalmente assenti o sregolati nelle cellule tumorali. Queste conclusioni suggeriscono che la perdita di questi meccanismi repressivi della retrotrasposizione è una fase importante nella genesi e progressione tumorale.

L'inibizione di RT in una nuova terapia differenziativa anti-cancro

L'introduzione della terapia HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy*) (59), una combinazione di inibitori di RT e proteasi HIV, ha avuto un notevole positivo impatto non soltanto nel trattamento dell'AIDS ma anche sull'incidenza di tumori AIDS-correlati (sarcoma di Kaposi, linfoma non-Hodgkin e tumore della cervice) che è significativamente ridotta nei pazienti trattati con HAART (60, 61).

Inoltre, recenti casi clinici offrono un'ulteriore prova di validità dimostrando che il trattamento con l'inibitore RT nevirapine ha ripristinato l'espressione della tiroglobulina, l'*uptake* di iodio radioattivo e causato la regressione delle lesioni metastatiche in una paziente affetta da carcinoma tiroideo (62, 63). Le terapie citotossiche correntemente utilizzate nella terapia del cancro hanno in molti casi effetti secondari devastanti a causa dell'alto livello di tossicità dei farmaci. Gli inibitori RT potrebbero offrire un approccio terapeutico non tossico per il trattamento del cancro, finalizzato non tanto a sopprimere le cellule trasformate quanto a differenziarle e ad bloccare la progressione metastatica. Terapie di questo tipo, chiamate terapie differenziative (64), sono basate sull'assunto che le cellule neoplastiche sono caratterizzate da un alterato stato differenziativo e che il trattamento con gli inibitori RT è in grado di innescare la loro riprogrammazione verso una condizione differenziata.

Conclusioni

Un meccanismo RT-dipendente nella genesi e progressione tumorale

Nella ricerca continua delle cause eziologiche del cancro e di terapie efficaci, in tempi diversi il cancro è stato considerato come una patologia genetica (65-67), genomica (68, 69), epigenetica (70, 71), evolutiva (72, 73) e differenziativa (74). Questa varietà di definizioni riflette le numerose prospettive dalle quali il cancro è stato esaminato. Nonostante l'ampio spettro di studi e di sforzi investiti, l'attuale stato dell'arte non consente ancora alcuna chiara e definitiva conclusione: il cancro emerge come una complessa patologia in cui tutti questi aspetti sono in qualche modo rappresentati, sebbene a livelli differenti.

Gli studi e i risultati riassunti in questo articolo suggeriscono un nuovo modello in cui la tumorigenesi è innescata da un'erronea attivazione di un meccanismo embrionale RT-dipendente che genera alterazioni cromatiniche e una riprogrammazione globale dell'espressione genica. Fisiologicamente, l'RT endogena codificata da LINE-1 è attiva alla fecondazione, continua a operare nell'embriogenesi precoce ed è silenziata nei tessuti adulti non-patologici. Se riattivata in modo improprio nelle cellule somatiche dei tessuti adulti, l'RT si comporta da agente causativo della genesi e della progressione tumorale, promuovendo de-differenziamento e proliferazione cellulare e riprogrammando globalmente l'espressione genica, il cui profilo "adulto" reverte ad uno di tipo "embrionale".

La predizione che una trascrizione di tipo embrionale sia riattivata nelle cellule tumorali (35, 36) ha ricevuto ampio supporto sperimentale: numerosi geni embrionali come OCT4 e altri geni tipici del preimpianto (75), geni "classici" dello sviluppo come Homeobox e Twist (76-79) e numerosi altri geni attivi nell'ontogenesi di organi e tessuti (80, 81) sono riespressi nei tumori. Nel complesso, analisi *microarray* di modelli murini suggeriscono che la trascrizione nei tumori ricapitolano con sorprendente analogia i *pattern* di sviluppo embrionale (82).

Dal nostro punto di vista, questo meccanismo retrotrasposonico-RT-dipendente integra due antiche previsioni sui modelli di regolazione: (i) l'ipotesi di McClintock degli "elementi di controllo", ovvero trasposoni mobili quali modulatori dell'espressione genica (83); (ii) la teoria di Britten and Davidson secondo la quale le sequenze di DNA ripetitivo sparse nel genoma possono costituire dei network con funzioni regolatorie su batterie di geni codificanti (84, 85). Entrambi questi modelli evocano un livello di controllo genico con inserzioni di elementi in specifici siti genomici seguito dall'instaurarsi di un controllo funzionale di natura epigenetica. L'esposizione delle cellule tumorali agli inibitori RT non-nucleosidici bloccherebbe questo processo, ripristinando un profilo di espressione genica di tipo "adulto" e ristabilendo un fenotipo differenziato.

Questo modello si contrappone alla teoria che il cancro sia la conseguenza di alterazioni geniche altamente individualizzate. Piuttosto, esso suggerisce che la genesi dei tumori sia causata dalla riattivazione ectopica di un meccanismo embrionale retrotrasposone-dipendente (86).

Ringraziamenti

Ringraziamo Enrico Cardarelli per l'assistenza tecnica fornita in molti degli esperimenti discussi in questo articolo. Questo lavoro è stato sostenuto da *grants* del Ministero della Salute 7OCF/6 e Q5F a C.S.

Bibliografia

1. Avery OT, MacLeod CM, McCarthy M. Studies on the chemical nature of the substance introducing transformation of Pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from Pneumococcus type III. *J Exp Med* 1944;79:137-58.

2. Loeb LA, Harris CC. Advances in chimica carcinogenesis: a historical review and prospective. *Cancer Res* 2008;68:6863-72.
3. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960;132:1497.
4. Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 1986;323:643-46.
5. Tabin CJ, Bradley SM, Bargmann CI, Weinberg RA, Papageorge AG, Scolnick EM, Dhar R, Lowy DR, Chang EH. Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 1982;300:143-49.
6. Bell DW. Our changing view of the genomic landscape of cancer. *J Pathol* 2010;220:231-43.
7. Ansorge WJ. Next-generation DNA sequencing techniques. *Nat Biotechnol* 2009;25:195-203.
8. Carter NP. Methods and strategies for analyzing copy number variation using DNA microarrays. *Nat Genet* 2007;39:S16-21.
9. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature* 2009;458:719-24.
10. Sjoblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, Mandelker D, Leary RJ, *et al.* The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 2006;314:268-74.
11. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, *et al.* An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme *Science* 2008;321:1807-12.
12. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, Koboldt DC, *et al.* Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med* 2009;361:1058-66.
13. Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, Davies H, *et al.* Patterns of somatic mutation in human cancer genome. *Nature* 2007;446:153-58.
14. Stephens PJ, McBride DJ, Lin ML, Varela I, Pleasance ED, Simpson JT, Stebbings LA, *et al.* Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes. *Nature* 2010;462:1005-10.
15. Cowin PA, Anglesio M, Etemadmoghadam D, Bowtell DDL. Profiling the Cancer Genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2010;11:133-59.
16. International Human Genome Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409:860-921.
17. Doolittle WF, Sapienza C. Selfish Genes, The Phenotype Paradigm And Genome Evolution. *Nature* 1980;284:601-03.
18. Orgel LE, Crick FH. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* 1980;284:604-07.
19. Kloosterman WP, Plaster RHA. The Diverse Functions of MicroRNAs in Animal Development and Disease. *Dev Cell* 2006;11:441-50.
20. Amaral PP, Dinger ME, Mercer TR, Mattick JS. The Eukaryotic Genome as an RNA Machine. *Science* 2008;319:1787-89.
21. Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions *Nat Rev Genet* 2009;10:155-59.
22. Bejerano G, Pheasant M, Makunin I, Stephen S, Kent WJ, Mattick JS, Haussler D. Ultraconserved Elements in the Human Genome. *Science* 2004;304,1321-5.
23. Visel A, Prabhakar S, Akiyama JA, Shoukry M, Lewis KD, Holt A, Plajzer-Frick I, Afzal V, Rubin EM, Pennacchio LA. Ultraconservation identifies a small subset of extremely constrained developmental enhancers. *Nat Genet* 2008;40:158-60.
24. Feschotte C. Transposable elements and the evolution of regulatory networks. *Nat Rev Genet* 2008;9:397-405.
25. Goodier JL, Kazazian HH. Retrotransposons revisited: the restraint and rehabilitation of parasites. *Cell* 2008;135:23-35.

26. Calin GA, Liu C, Ferracin M, Hyslop T, Spizzo R, Sevignani C, Fabbri M, Cimmino A, Lee EG, Wojcik SE, Shimizu M, Tili E, Rossi S, Taccioli C, Pichiorri F, Liu X, Zupo S, Herlea V, *et al.* Ultraconserved Regions Encoding Ncrnas Are Altered In Human Leukemias And Carcinomas. *Cancer Cell* 2007;12:215-29.
27. Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet* 2009;10:704-14.
28. Kota SK, Balasubramanian S. Cancer therapy via modulation of micro RNA levels: a promising future. *Drug Discovery Today* 2010; Aug 6 (online prima della stampa)
29. Iskow RC, McCabe MT, Mills RE, Torene S, Pittard WS, Neuwald AF, Van Meir EG, Vertino PM, Devine SE. Natural mutagenesis of human genomes by endogenous retrotransposons. *Cell* 2010;141:1253-61.
30. Cordaux R, Batzer MA. The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat Rev Genet* 2009;10:693-703.
31. Giordano R, Magnano AR, Zaccagnini G, Pittoggi C, Moscufo N, Lorenzini R, Spadafora C. Reverse transcriptase activity in mature spermatozoa of mouse. *J Cell Biol* 2000;148:1107-13.
32. Pittoggi C, Sciamanna I, Mattei E, Beraldi R, Lobascio AM, Mai A, Quaglia MG, Lorenzini R, Spadafora C. A role of endogenous reverse transcriptase in murine early embryo development. *Mol Reprod Dev* 2003;66:225-36.
33. Beraldi R, Pittoggi C, Sciamanna I, Mattei E, Spadafora C. Expression of LINE-1 retroposons is essential for murine preimplantation development. *Mol Reprod Dev* 2006;73:279-87.
34. Naas TP, DeBerardinis RJ, Moran JV, Ostertag EM, Kingsmore SF, Seldin MF, Hayashizaki Y, Martin SL, Kazazian HH. An actively retrotransposing, novel subfamily of mouse L1 elements. *EMBO J* 1998;17:590-97.
35. Virchow RLK. *Cellular pathology as based upon physiological and pathological histology: twenty lectures delivered in the Pathological Institute of Berlin during the months of February, March, and April, 1858.* London: John Churchill; 1860.
36. Bailey P, Cushing H. Medulloblastoma cerebelli: a common type of midcerebellar glioma of childhood. *Arch Neurol Psychiatry* 1925;14:192-223.
37. Mangiacasale R, Pittoggi C, Sciamanna I, Careddu A, Mattei E, Lorenzini R, Travaglini L, Landriscina M, Barone C, Nervi C, Lavia P, Spadafora C. Exposure of normal and transformed cells to nevirapine, a Reverse Transcriptase inhibitor, reduces cell growth and promotes differentiation. *Oncogene* 2003;22:2750-61
38. Ren J, Nichols C, Bird L, Chambelain P, Weaver K, Short, S, Stuart DI, Stammers DK. Structural mechanisms of drug resistance for mutations of codons 181 and 188 in HIV-1 reverse transcriptase improve resilience of second generation non-nucleoside inhibitors. *J Mol Biol* 2001;312:795-805.
39. Sciamanna I, Landriscina M, Pittoggi C, Quirino M, Mearelli C, Beraldi R, Mattei E, Serafino A, Cassano A, Sinibaldi-Vallebona P, Garaci E, Barone C, Spadafora C. Inhibition of endogenous Reverse Transcriptase antagonizes human tumour growth. *Oncogene* 2005;24:3923-31.
40. Brouha B, Schustak J, Badge RM, Lutz-Prigge S, Farley AH, Moran JV, Kazazian HH. Jr. Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:5280-85.
41. Oricchio E, Sciamanna I, Beraldi R, Tolstonog GV, Schumann GG, Spadafora C. Distinct roles for LINE-1 and HERV-K retroelements in cell proliferation, differentiation and tumour progression. *Oncogene* 2007;26:4226-33.
42. Franco R, Schoneveld O, Georgakilas AG, Panayiotidis MI. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Letters* 2008;266:6-11.
43. Bonasio R, Tu S, Reinberg D. Molecular Signals of Epigenetic States. *Science* 2010;330:612-16.

44. Hagan CR, Rudin CM. Mobile genetic element activation and genotoxic cancer therapy potential clinical implications. *Am J Pharm* 2002;2:25-35.
45. Stribinskis V, Ramos KS. Activation of human long interspersed nuclear element 1 retrotransposition by benzo(a)pyrene, an ubiquitous environmental carcinogen. *Cancer Res* 2006;66:2616-20.
46. Cho K, Lee Y, Greenhalgh DG. Endogenous retroviruses in systemic response to stress signals. *SHOCK* 2008;30:105-16.
47. Goodier JL, Kazazian HH Jr. Retrotransposons Revisited: The Restraint and Rehabilitation of Parasites. *Cell* 2008;135:23-35.
48. Feschotte C. Transposable element and the evolution of regulatory networks. *Nature Rev Genet* 2008;9:397-405.
49. Tomilin NV. Regulation of mammalian gene expression by retroelements and non-coding tandem repeats. *BioEssays* 2008;30:338-48.
50. Whitelaw E, Martin DIK. Retrotransposons as epigenetic mediators of phenotypic variation in mammals. *Nat Genet* 2001;27:361-65.
51. Chow JC, Ciaudo C, Fazzari MJ, Mise N, Servant N, Glass JL, Attreed M, Avner P, Wutz A, Barillot E, Grealley JM, Voinnet O, Heard E. LINE-1 Activity in Facultative Heterochromatin Formation during X Chromosome Inactivation. *Cell* 2010;141:956-69.
52. Maksakova IA, Mager DL, Reiss D. Keeping active endogenous retroviral-like elements in check: the epigenetic perspective. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:3329-47.
53. Schumann GG, Gogvadze EV, Osanai-Futahashi M, Kuroki A, Muenk C, Fujiwara H, Ivics Z, Buzdi AA. Unique Functions of Repetitive Transcriptomes. *Inter Rev Cell Mol Biol* 2010;285:115-88.
54. Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 1997;13:335-40.
55. Esnault C, Heidmann O, Delebecque F, Dewannieux M, Ribet D, Hance AJ, Heidmann T, Schwartz O. APOBEC3G cytidine deaminase inhibits retrotransposition of endogenous retroviruses. *Nature* 2005;433:430-33.
56. Esnault C, Millet J, Schwartz O, Heidmann T. Dual inhibitory effects of APOBEC family proteins on retrotransposition of mammalian endogenous retroviruses. *Nucl Acids Res* 2006;34:1522-31.
57. Schumann GG. APOBEC3 proteins: major players in intracellular defence against 42 LINE-1-mediated retrotransposition. *Biochem Soc Trans* 2007;35:637-42.
58. Yang N, Kazazian HH. L1 retrotransposition is suppressed by endogenously encoded small interfering RNAs in human cultured cells. *Nat Struct Mol Biol* 2006;13:763-71.
59. Esté JA, Cihlar T. Current Status And Challenges Of Antiretroviral Research And Therapy. *Antiviral Res* 2010;85:25-3.
60. Tirelli U, Bernardi D, Spina M, Vaccher E. AIDS-related tumours: integrating antiviral and anticancer therapy. *Critic Rev Oncol/Hemat* 2002;41:299-315.
61. Monini P, Sgadari C, Toschi E, Barillari G, Ensoli B. Antitumour effects of antiretroviral therapy. *Nat Rev Cancer* 2004;4:861-75.
62. Landriscina M, Modoni S, Fabiano A, Fersini A, Barone C, Ambrosi A, Cignarelli M. Cell differentiation and iodine-131 uptake in poorly differentiated thyroid tumour in response to nevirapine. *Lancet Oncol* 2006;7:877-9.
63. Modoni S, Landriscina M, Fabiano A, Fersini A, Urbano N, Ambrosi A, Cignarelli M. Reinduction of cell differentiation and 131I uptake in a poorly differentiated thyroid tumour in response to the reverse transcriptase (RT) inhibitor nevirapine. *Cancer Biother Radiopharm* 2007;22:289-95.
64. Leszczyniecka M, Roberts T, Dent P, Grant S, Fisher PB. Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical applications *Pharmacol Ther* 2001;90:105-56.
65. Hahn WC, Weinberg RA. Modeling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2:331-41.

66. Vogelstein B, Kinzler KW Cancer genes and the *pathways* they control. *Nat Med* 2004;10:789-99.
67. Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjoblom T, Leary RJ, Shen D, *et al.* The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* 2007;318:1108-13.
68. Duesberg P. Does aneuploidy or mutation start cancer?. *Science* 2005;307:41.
69. Heng HH. The genome-centric concept: resynthesis of evolutionary theory. *Bioessays* 2009;31:512-25.
70. Jones PA, Baylin SB. The Epigenomics of Cancer. *Cell* 2007;128:683-92.
71. Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The Epigenetic Progenitor Origin Of Human Cancer. *Nat Rev Genet* 2006;7:21-33.
72. Merlo LMF, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer* 2006;6:924-35.
73. Domazet-Lošo T, Tautz D. Phylostratigraphic tracking of cancer genes suggests a link to the emergence of multicellularity in metazoa. *BMC Biol* 2010;8:66.
74. Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol/Hematol* 2004;51:1-28.
75. Monk M, Holding C. Human embryonic genes re-expressed in cancer cells. *Oncogene* 2001;20:8085-91.
76. Cillo C, Faiella A, Cantile M, Boncinelli E. Homeobox genes an cancer. *Exp Cell Res* 1999;248:1-9.
77. Owens BM, Hawley RG. HOX and non-HOX homeobox genes in leukemic hematopoiesis. *Stem Cells* 2002;20:364-79.
78. Samuel S, Naora H. Homeobox gene expression in cancer: insights from developmental regulation and deregulation. *Eur J Cancer* 2005;41:2428-37.
79. Ansieau S, Bastid J, Doreau A, Morel AP, Bouchet BP, Thomas C, Fauvet F, Puisieux I, Doglioni C, Piccinin S, Maestro R, Voeltzel T, Selmi A, Valsesia-Wittmann S, Caron de Fromentel C, Puisieux A. Induction of EMT by Twist proteins as a collateral effect of tumour promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell* 2008;14:79-89.
80. Boutet A, Esteban MA, Maxwell PH, Nieto MA. Reactivation of *Snail* genes in renal fibrosis and carcinomas. *Cell Cycle* 2007;66:638-42.
81. Schaeffer EM, Marchionni L, Huang Z, Simons B, Blackman A, Yu W, Parmigiani G, Barman DM. Androgen induced programs for prostate epithelial growth and invasion arise in embryogenesis and are reactivated in cancer. *Oncogene* 2008;27:7180-91.
82. Kaiser S, Park YK, Franklin JL, Halberg LB, Yu M, Jessen WJ, Freudenberg J, Chen X, *et al.* Transcriptional recapitulation and subversion of embryonic colon development by mouse colon tumour models and human colon cancer. *Genome Biol* 2007;8:R131.
83. McClintock B. Controlling elements and the gene. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1956;21:197-216.
84. Britten RJ, Davidson EH. Gene regulation for higher cells: a theory. *Science* 1969;165:349-57.
85. Britten RJ, Davidson EH. Repetitive and non-repetitive DNA sequences and a speculation on the origins of evolutionary novelties. *Q Rev Biol* 1971;46:111-38.
86. Wilkins AS. The enemy within: An epigenetic role of retrotransposons in cancer initiation. *Bioessays* 2010;32:856-65.
87. Landriscina M, Fabiano A, Altamura S, Bagalà C, Piscazzi A, Cassano A, Spadafora C, Giorgino F, Barone C, Cignarelli M. Reverse transcriptase inhibitors down-regulate cell proliferation *in vitro* and *in vivo* and restore thyrotropin signaling and iodine uptake in human thyroid anaplastic carcinoma. *J Clin End Met* 2005;90:5663-71.