



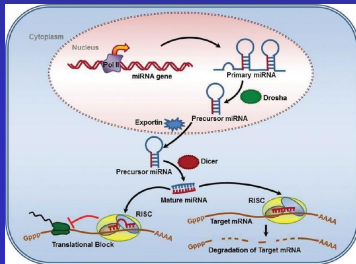
Università di Ferrara  
Corso di Laurea in Scienze Motorie  
Corso di Genetica e Biologia  
Primo anno  
AA 2015-2016



# I microRNA: il loro geni e i loro target

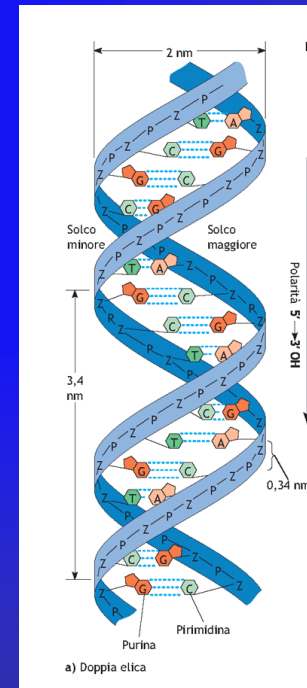
*Dott. Ilaria Bononi*

4 Novembre 2015

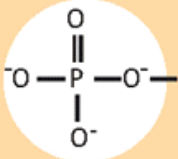
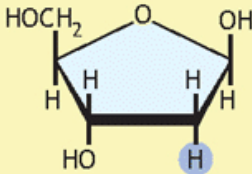
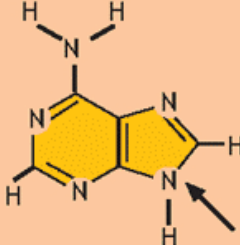
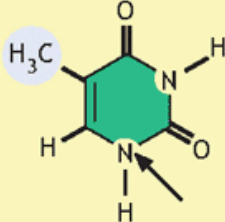
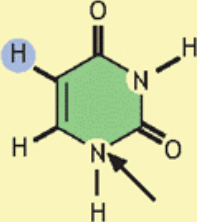
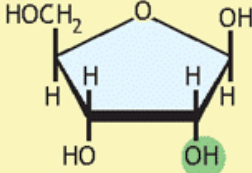
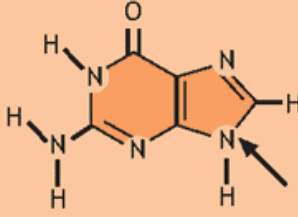
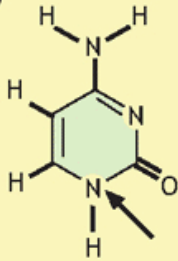


...ma prima di parlare dei miRNA vediamo alcuni cenni di biologia molecolare:

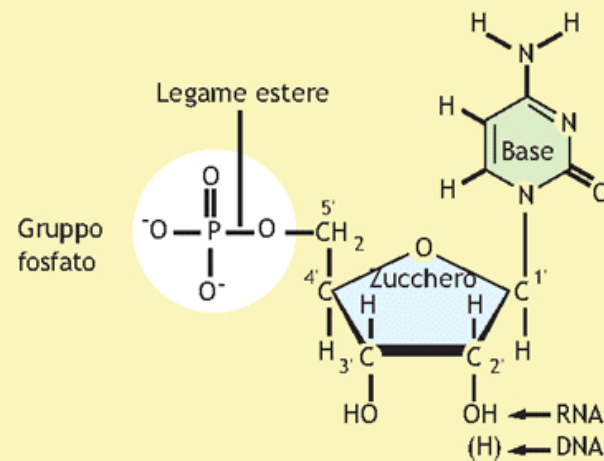
Gli acidi nucleici  
Nucleotidi  
DNA ed RNA  
Appaiamento delle basi  
Direzionalit 



# Il nucleotide

Gruppo fosfato	Zuccheri	Basi		
		Purine	Pyrimidine	
	 <p><math>\beta</math>-D-desossiribosio (nel DNA)</p>	 <p>Adenina (A)</p>	 <p>Timina (T) (nel DNA)</p>	 <p>Uracile (U) (nell'RNA)</p>
	 <p><math>\beta</math>-D-ribosio (nell'RNA)</p>	 <p>Guanina (G)</p>	 <p>Citosina (C)</p>	

## Nucleotide



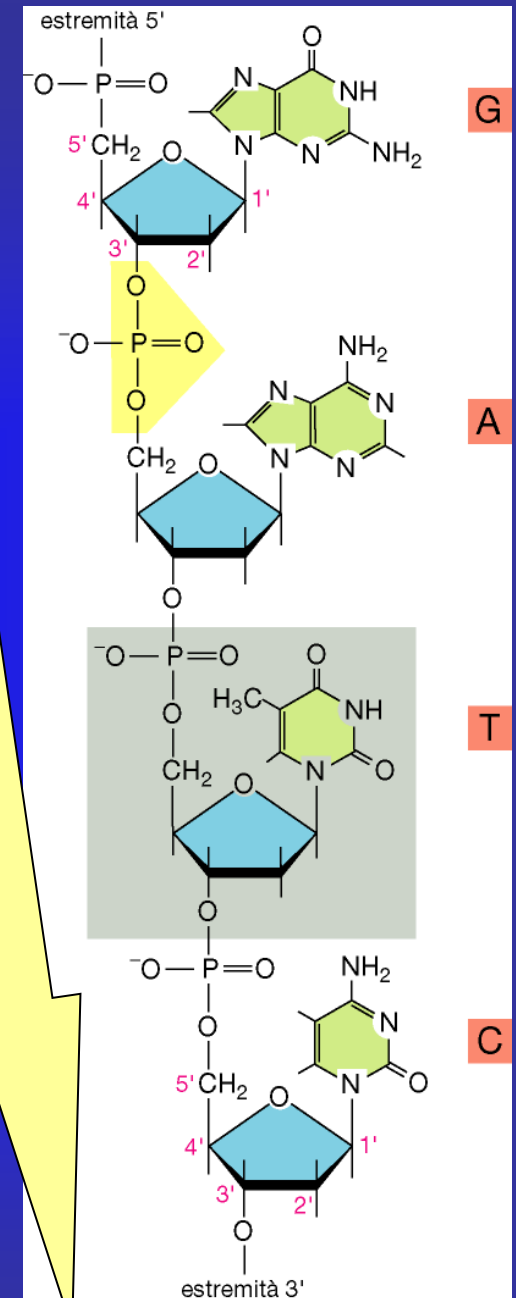
# Il legame fosfodiester

Le catene di acido nucleico vengono sintetizzate a partire da nucleotidi trifosfato ricchi di **energia**, tramite una reazione di **condensazione** che libera pirofosfato inorganico, mentre si forma il legame fosfodiester

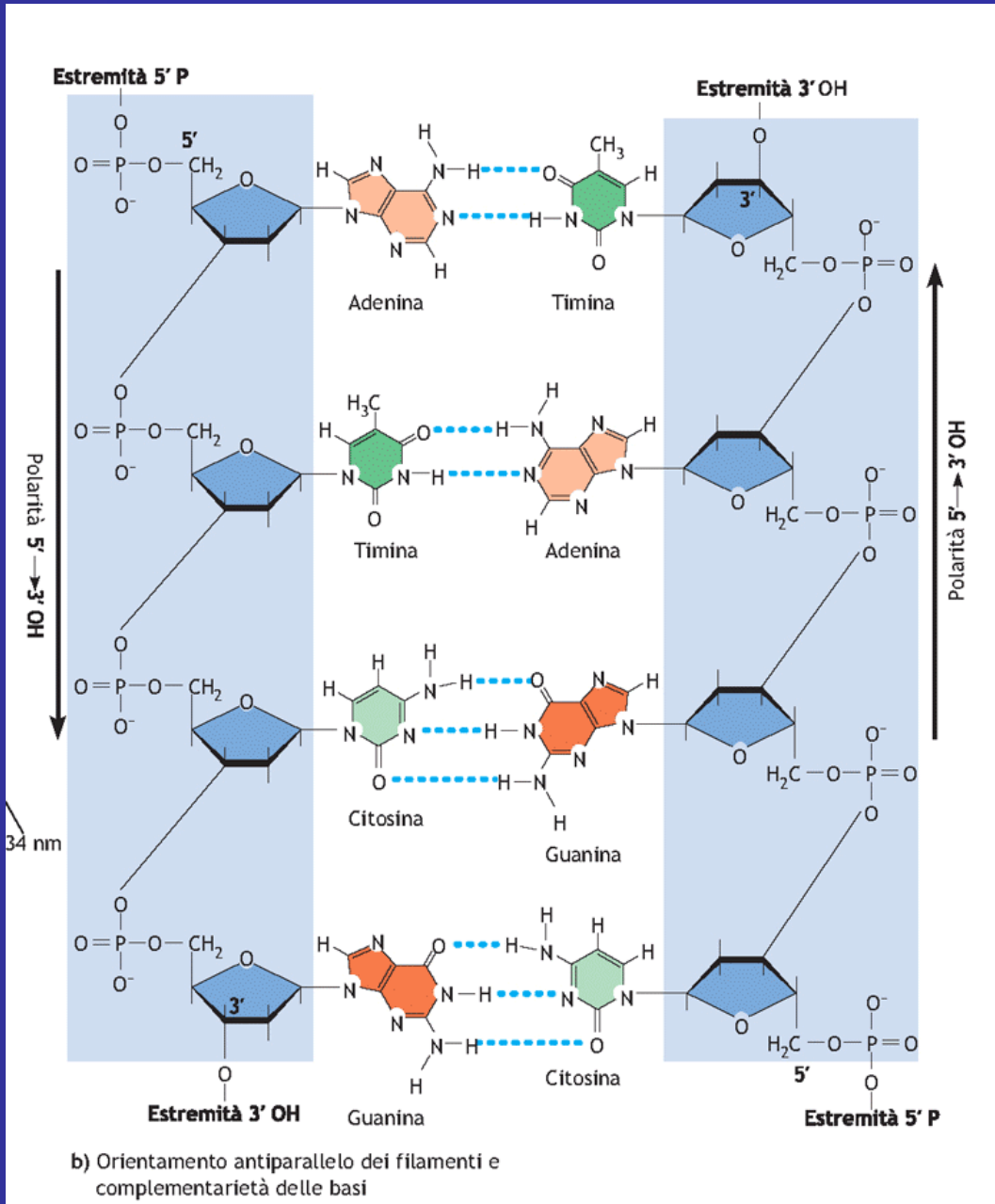
## Molecole direzionali

Gli acidi nucleici hanno una precisa direzionalità, cioè una polarità strutturale:

- Gli acidi nucleici sono sintetizzati dal 5' al 3'
- la sequenza nucleotidica viene scritta nello stesso ordine



# DNA: eliche antiparallele



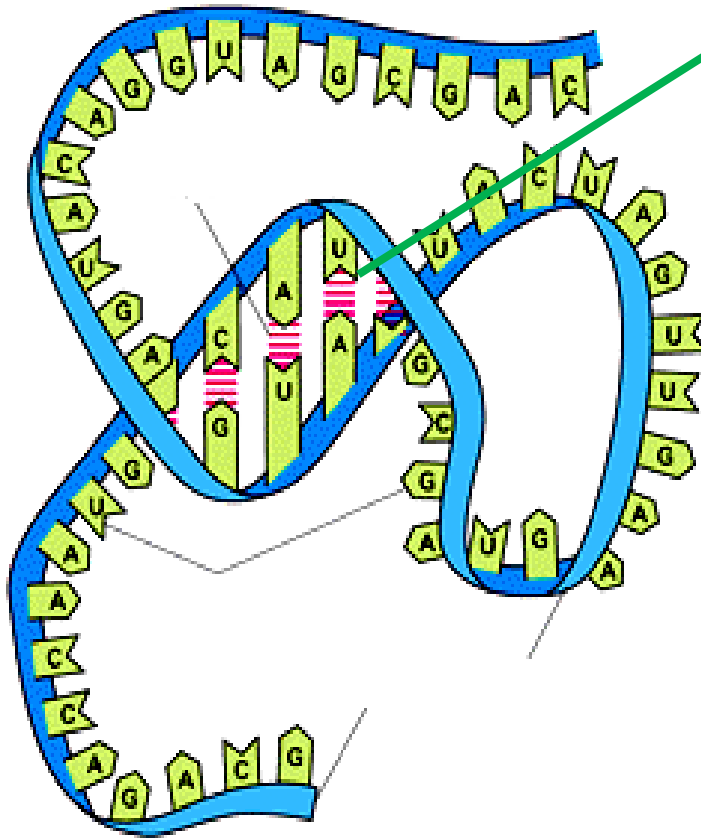
Le 2 singole eliche sono antiparallele, questo significa che le eliche corrono in direzioni opposte avendo entrambe la stessa polarità:

5'P → 3'OH

# Struttura degli acidi nucleici

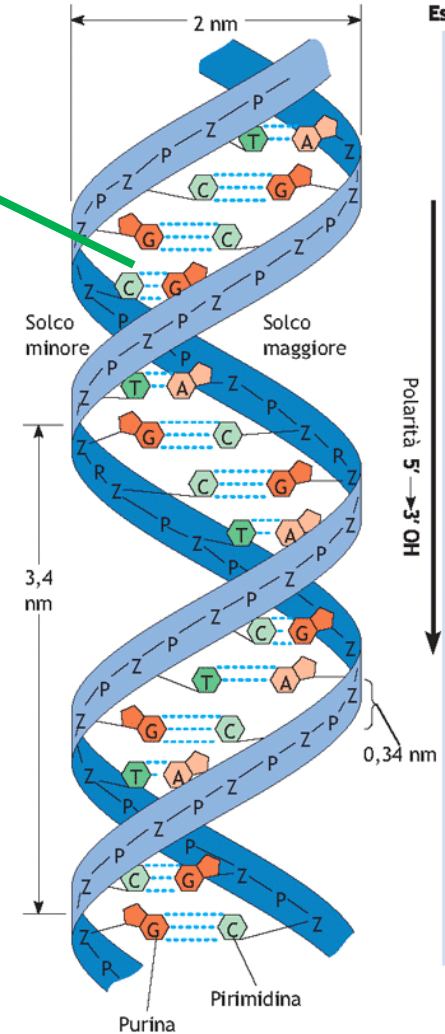
RNA

DNA



Appaiamento delle basi

Singola catena

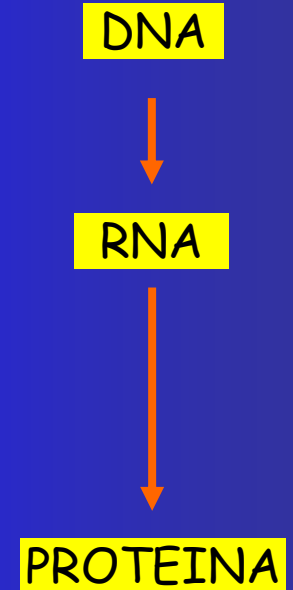
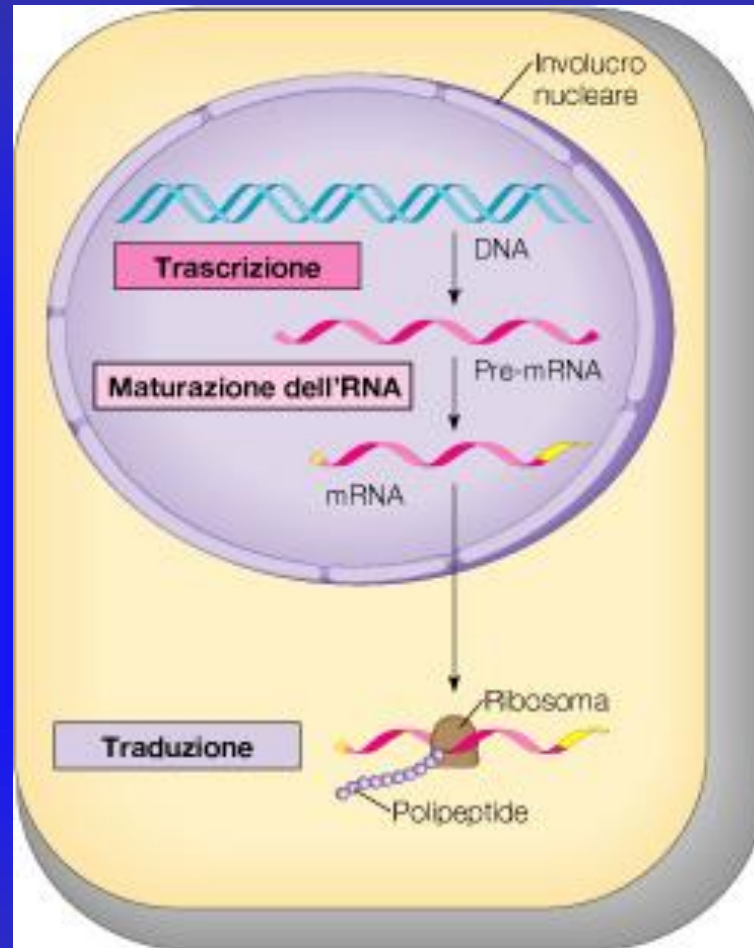


a) Doppia elica

Doppia catena

# Flusso dell'informazione genetica - Dogma centrale

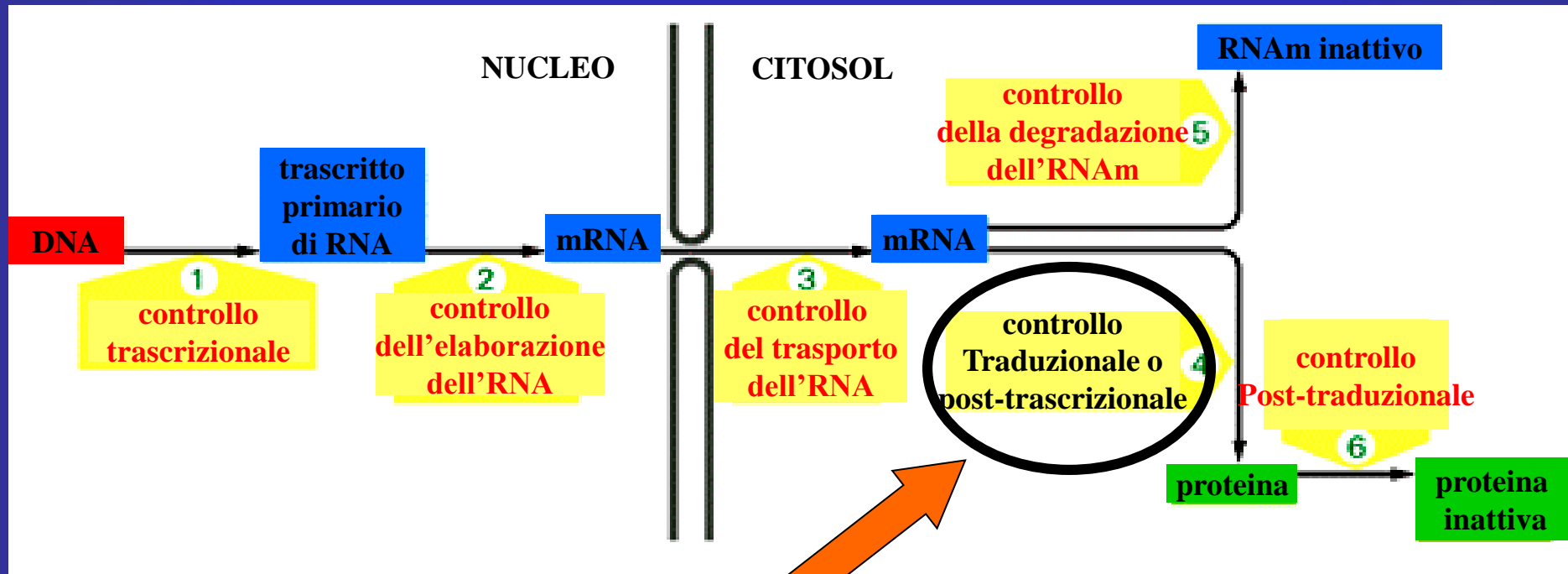
Quando la cellula ha bisogno di una particolare proteina, la sequenza nucleotidica di un preciso tratto di DNA, situato sulla infinitamente lunga molecola di un cromosoma, viene inizialmente ricopiata ad RNA che farà da stampo per dirigere la sintesi delle proteine



**Dogma centrale della biologia molecolare:**

**L'informazione genetica fluisce continuamente dal DNA all'RNA alle proteine**

# Il controllo dell'espressione dei geni negli eucarioti

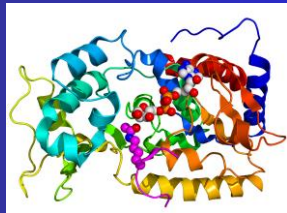
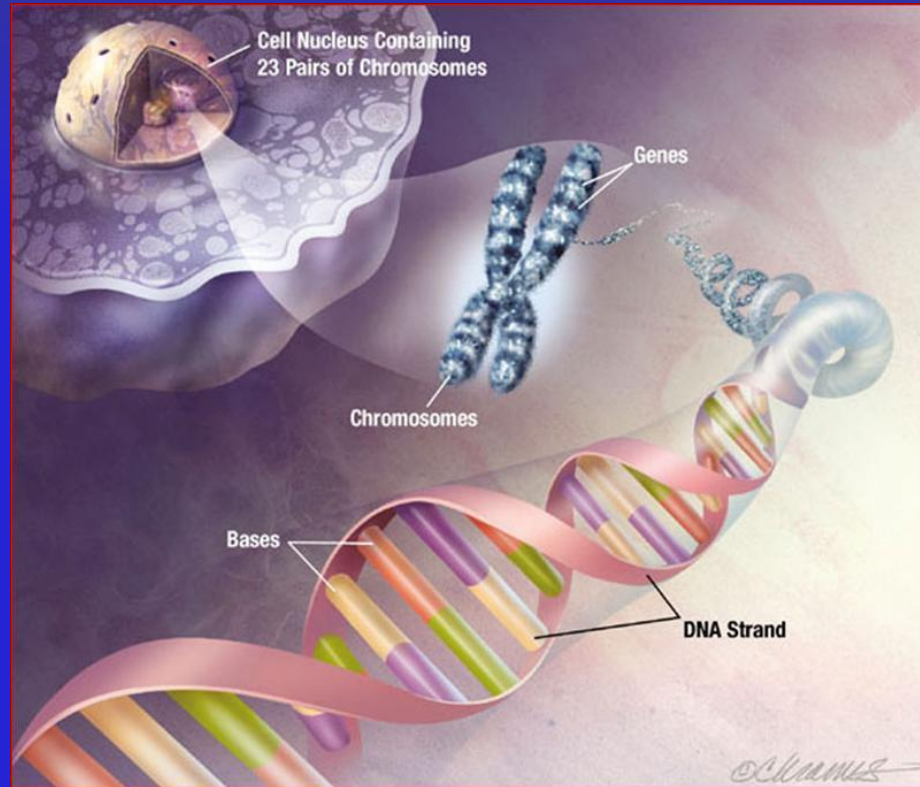


L'espressione genica può essere regolata in più punti del percorso che conduce dal DNA all'RNA e quindi alle proteine



# Flusso dell'informazione genetica

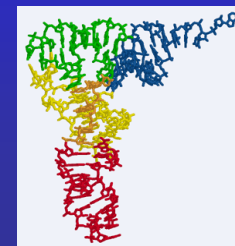
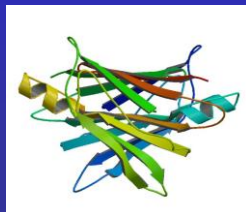
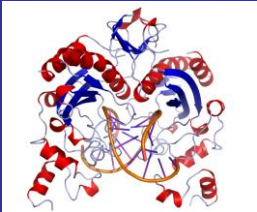
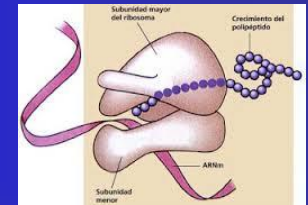
Stima del numero  
di geni presenti  
sul genoma  
umano:  
50 000 geni



Proteine

Prodotti genici

RNA



...ma non solo...

# RNA: una molecola per molteplici funzioni

Classici RNA coinvolti nella sintesi proteica:

<b>mRNA</b>	RNA messaggero
<b>rRNA</b>	RNA ribosomiale
<b>tRNA</b>	RNA transfert

RNA coinvolti in duplicazione, compattamento, splicing, maturazione dell'RNA e sorting proteine:

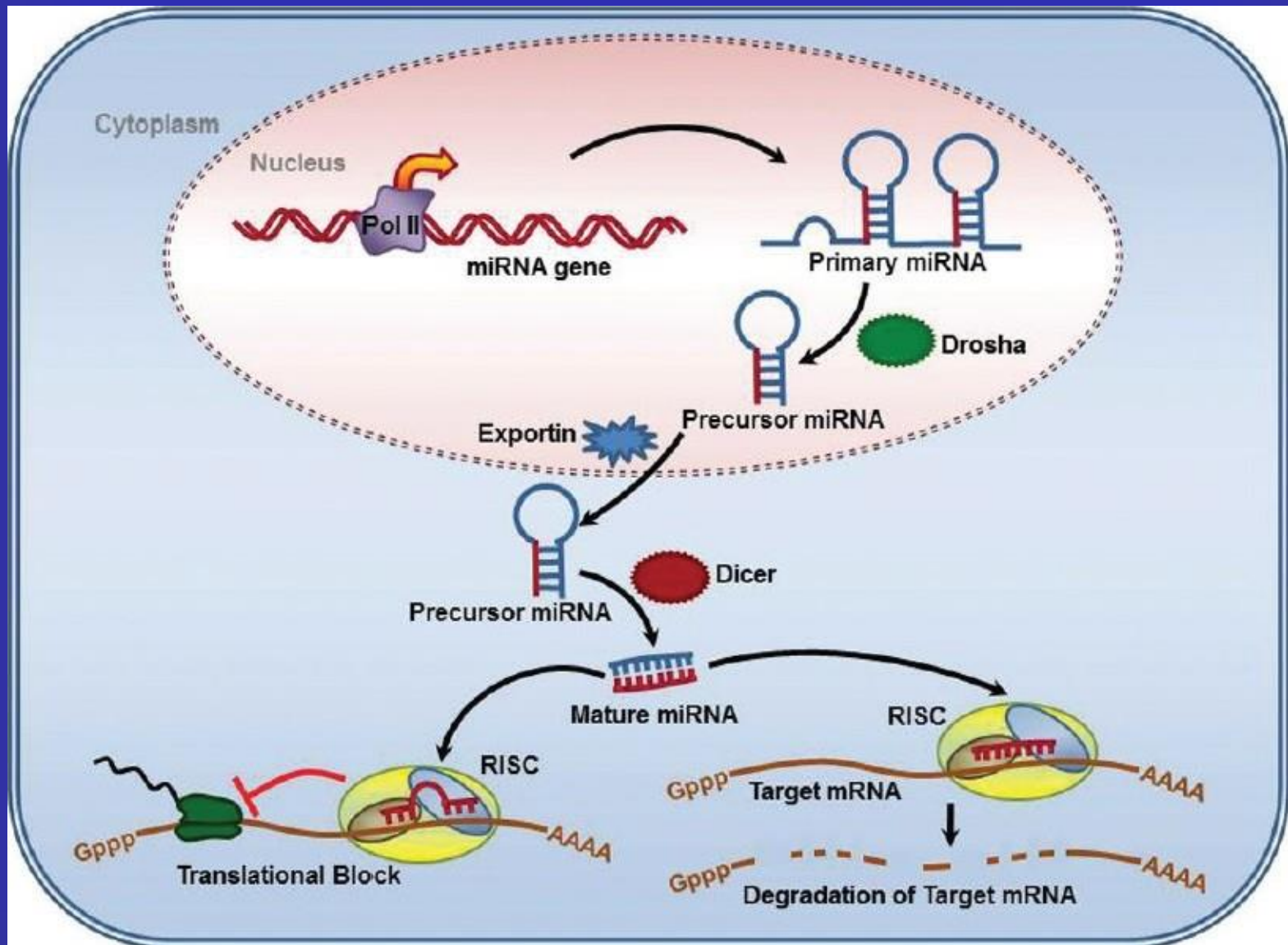
<b>TERC</b> <i>(Telomerase RNA component)</i>	Coinvolto nella duplicazione del DNA
<b>Xist</b> <i>(X inactive-specific transcript)</i>	Coinvolto nella formazione del corpo di Barr
<b>snRNA</b> <i>(small nuclear RNA)</i>	Coinvolti nello splicing
<b>snoRNA</b> <i>(small nucleolar RNA)</i>	Coinvolti nella maturazione dell'rRNA
<b>scRNA</b> <i>(small cytoplasmic RNA)</i>	Coinvolti nel sorting delle proteine

# RNA: una molecola per molteplici funzioni

RNA non codificanti coinvolti nel controllo dell'espressione genica:

<b>miRNA</b> <i>(micro-RNA)</i>	Regolano negativamente l'espressione genica
<b>siRNA</b> <i>(Small interfering RNA)</i>	<p>Piccoli RNA sintetizzati chimicamente o di origine virale (<u>invece i <b>miRNA</b> sono endogeni!</u>)</p> <p>Hanno la funzione di degradare l'mRNA bersaglio attraverso un meccanismo definito RNA interference (RNAi)</p> <p>Agiscono solo per complementarità perfetta: ogni siRNA può avere un unico mRNA bersaglio (<u>invece i <b>miRNA</b> possono avere più bersagli!</u>)</p>
<b>piRNA</b> <i>(PiwiRNA)</i>	Generati da lunghi precursori ssRNA agiscono grazie alla proteina piwi (Ago) e sono coinvolte nello sviluppo delle cellule germinali
<b>ra siRNA</b> <i>(repeat associated small interfering RNA)</i>	Sottofamiglia dei piRNA, ma ancora tutta da scoprire
<b>ncRNA</b> <i>(longer non-coding RNA)</i>	70-5000 nt: funzione sconosciuta

# MicroRNA

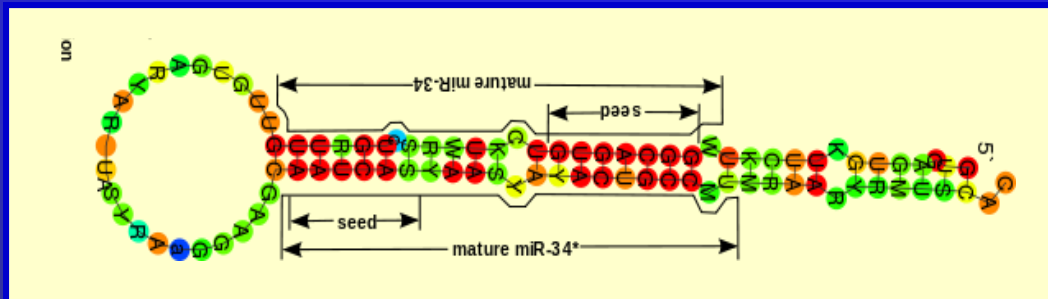


# Cosa sono i MicroRNA o miRNA?

I microRNA sono un gruppo di piccoli RNA non codificanti a singolo filamento (ss) che sono stati identificati in molti organismi

Sono formati da 18-22 nucleotidi

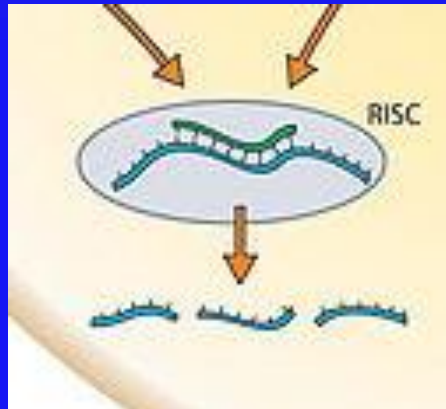
Sono originati da un precursore a stem-loop



# Funzione dei microRNA

Il loro ruolo fondamentale è quello di

regolare negativamente l'espressione genica  
a livello post-trascrizionale  
(post-transcriptional gene silencing, PTGS)



I miRNA agiscono mediante il riconoscimento di specifici mRNA targets al fine di determinarne la degradazione o la repressione della traduzione.

- La funzione di molti miRNA non è nota, ma per alcuni è stata provata la partecipazione a processi fisiologici e patologici:
- Hanno un ruolo in proliferazione, apoptosi e differenziazione cellulare.
- Possono essere deregolati in malattie umane
- Possono essere coinvolti nella tumorigenesi.



# Conservazione dei miRNA

Table II. **miRNAs conserved across phyla**

Name	Sequence <sup>1</sup>	Homologues <sup>2</sup>
miR-1	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGGAG	C, D, H
miR-2	UAUCACAGCCAGCUUUGA(G/U)G(U/A)GC <sup>3</sup>	C, D
miR-7	UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGU	D, H
miR-34	AGGCAGUGUGGUUAGCUGGUUG	C, D, H
miR-60	UAUUAUGCACAUUUUCUAGUUCA	C, D, H
miR-79	AUAAAGCUAGGUUACCAAAGCU	C, D
miR-84	UGAGGUAGUAUGUAAUAUUGUA	C, D, H
miR-87	GUGAGCAAAGUUUCAGG(U/A)GU <sup>3</sup>	C, D, H

<sup>1</sup>RNA sequences are deduced from cDNA sequencing; no RNAs have yet been sequenced.

<sup>2</sup>C, *C. elegans*; D, *D. melanogaster*; H, *H. sapiens*.

<sup>3</sup>Letters in parentheses indicate variations in otherwise identical miRNAs from different organisms or variant genes within one organism.

# Scoperta dei miRNA



Tappe della scoperta dei miRNA:

Chalfie, 1981;

Ambros, 1989;

Ruvkun, 1991

Lee, 1993

Wightman, 1993

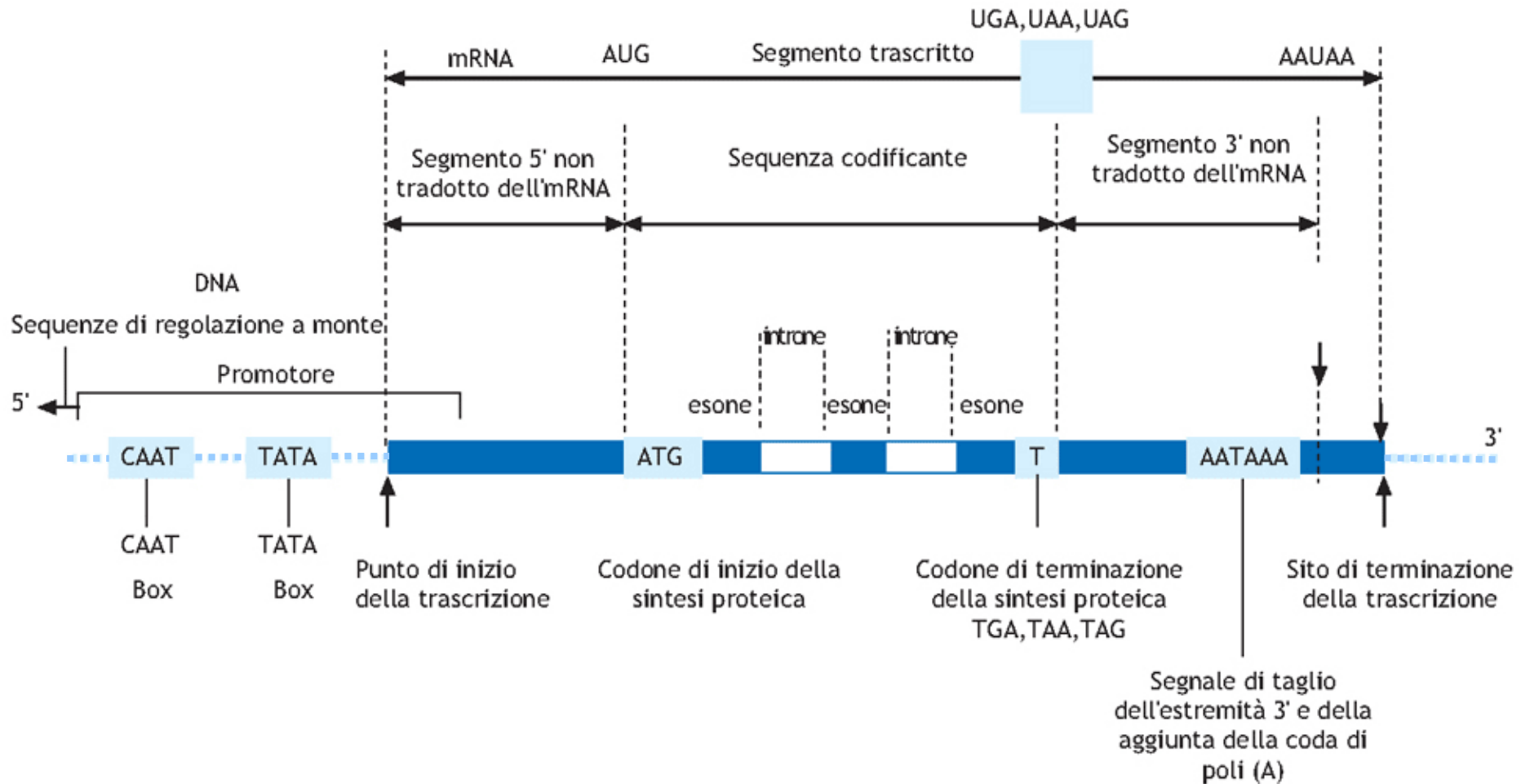
Reinhart, 2000

2001: Dimostrata l'esistenza di una grande nuova classe di RNA con un potenziale ruolo regolativo (miRNA)

- sono una nuova abbondante classe di riboregolatori che possono regolare l'espressione genica a livello post-trascrizionale attraverso l'appaiamento delle basi nel 3'UTR dell'mRNA target.



# Come si legge un gene

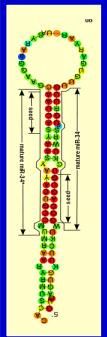




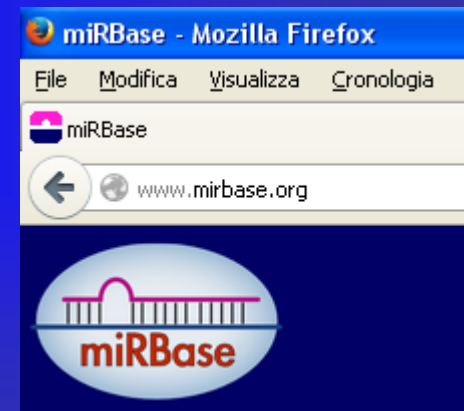
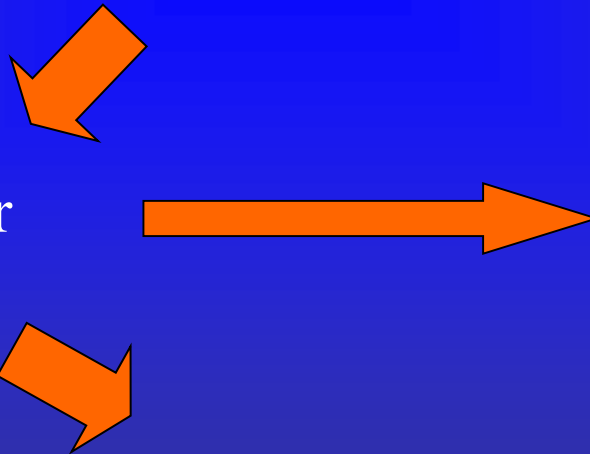
# The miRNA Registry: miRBase

Nel 2003 è stato creato un miRNA database: in base alle seguenti osservazioni:

1. I miRNA sono prodotti da un trascritto precursore di 70-100 nt con un struttura a stem-loop
2. I miRNA sono altamente conservati tra le specie
3. I miRNA hanno un pattern caratteristico di divergenza nell'evoluzione



Approccio di  
bioinformatica per  
predire i miRNA



e poi molti sono stati confermati con northern blot e PCR



## Stima del numero di miRNA

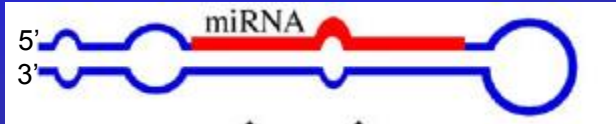
La stima della quantità di miRNA nel genoma è vicina all'1%



simile a quella di altre grandi famiglie geniche con ruolo regolatorio, come quelle che codificano per i fattori di trascrizione

Ad oggi sono stati scoperti circa 2000 miRNA

# Nomenclatura

ESEMPIO	NOMENCALTURA
miR-15	I miRNA sono identificati con un numero
miR-16	Il prossimo miRNA senza somiglianza viene chiamato con i numero successivo MiRNA omologhi in organismi diversi vengono chiamati con lo stesso nome
miR-16-1 e miR-16-2	Forme mature identiche ma che vengono prodotte da loci diversi vengono indicate con lo stesso nome, ma con un suffisso
miR-181a e miR-181b	Differenze in 1 o 2 basi vengono indicati con un suffisso
miR-142-5p (sul braccio in 5') e miR-142-3p (sul braccio in 3')	Se un precursore a stem-loop dà origine a 2 miRNA, uno per ogni braccio vengono chiamati con il seguente suffisso: 
miR-191*	La forma meno espressa può essere indicata con un asterisco

# Genomica dei miRNA

## MiRNA

50%  
miRNA intragenici

40%  
in introni di geni che codificano  
per proteine

Molti cluster dei miRNA sono:  
-unità trascrizionali singole  
-o si sovrappongono con il trascritto ospite,  
con introni o esoni  
-in alcuni casi dipende dello splicing  
alternativo del gene ospite  
-(trascritti policistronici)  
-o si sovrappongono con unità trascrizionali  
trascritte sulla strand opposta

I geni ospiti codificano per proteine  
coinvolte nello sviluppo embrionale e nel  
ciclo cellulare.

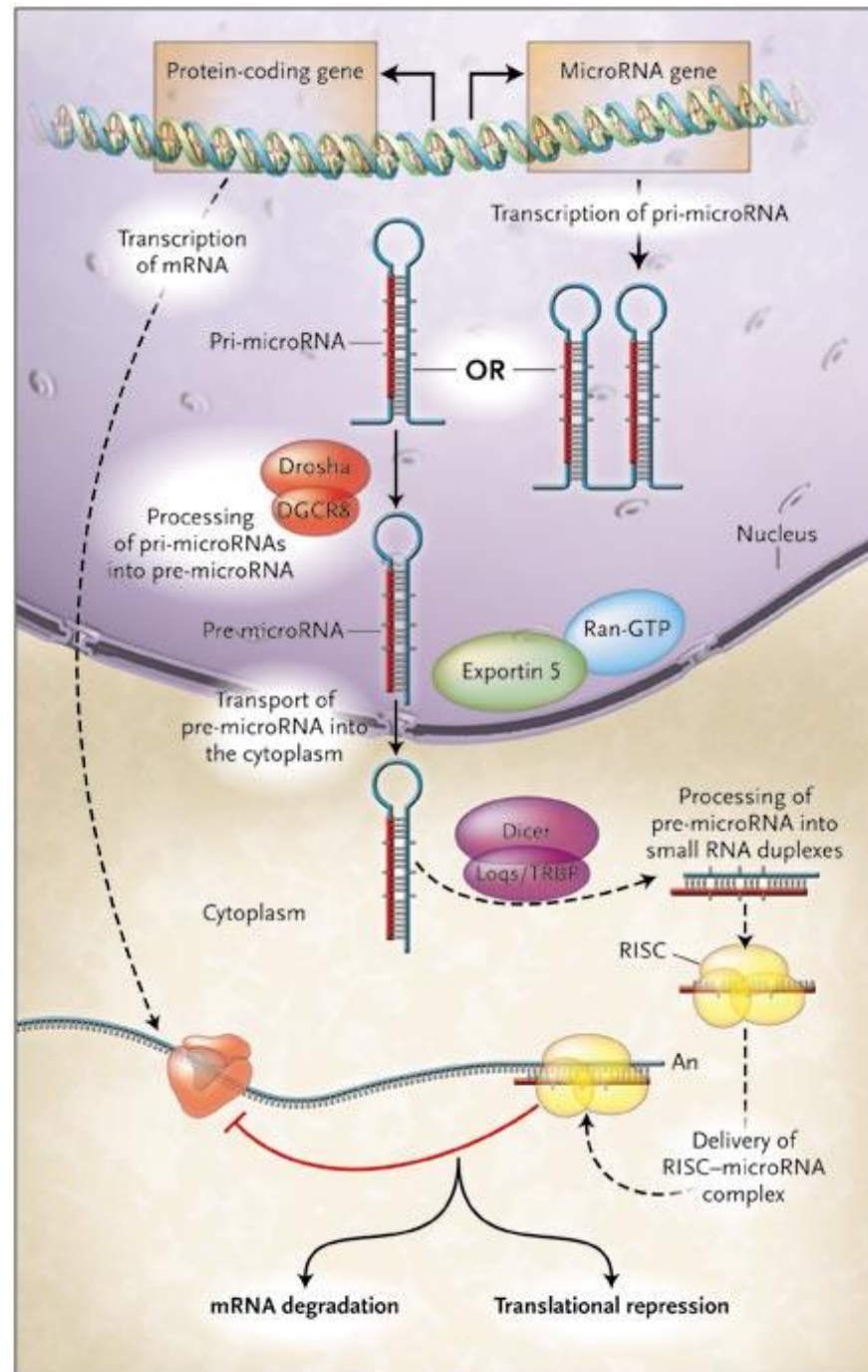
10%  
in introni di  
trascritti non  
codificanti

Molti miRNA si  
trovano in trascritti che  
non codificano  
proteine, classificati  
ncRNAs (long  
noncoding RNA).

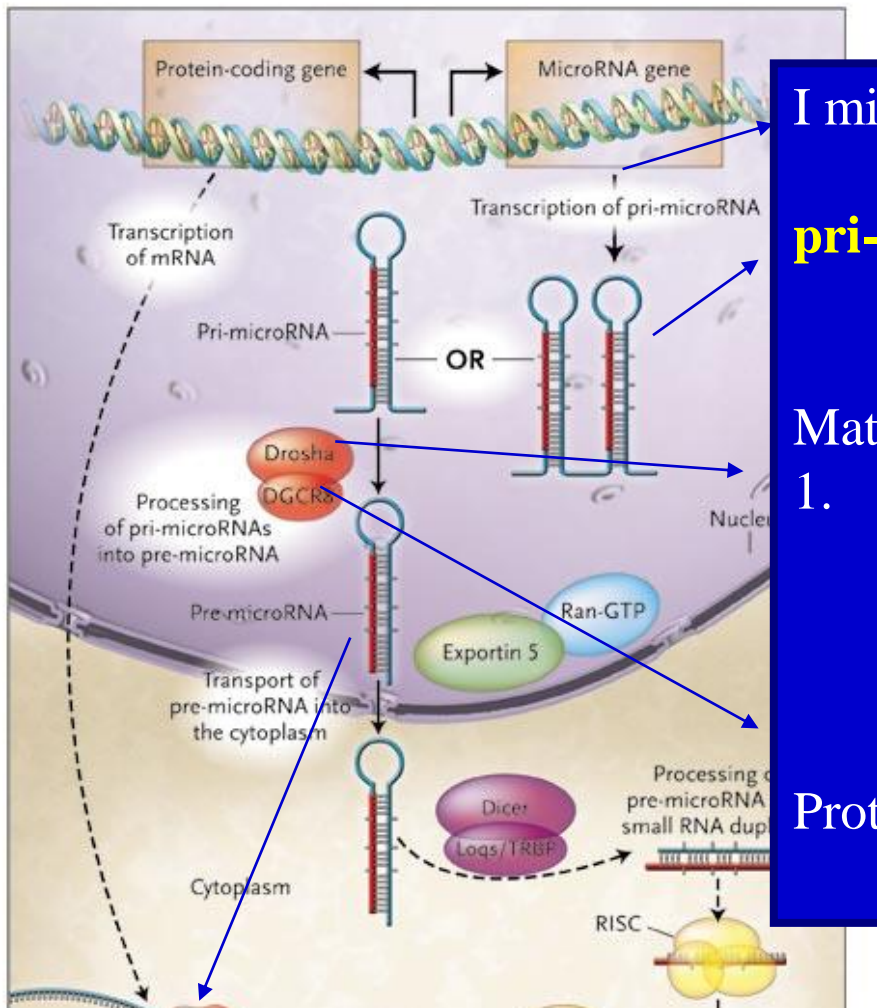
50%  
sono unità  
trascrizionali  
indipendenti  
con un  
promotore e  
segnali di  
poli-  
adenilazione

# Biogenesi dei miRNA

## Azione dei miRNA



# Biogenesi dei miRNA -1



I miRNA vengono trascritti dalla **RNA pol II**

**pri-miRNA**: precursore primario: 100-1000 nt;  
ha il 5'-cap, il poly-A e può avere introni

Maturazione dei miRNA: 3 fasi:

1. Cropping: taglio operato da **Drosha**: una endonucleasi ribonucleasi III nucleare capace di tagliare la regione fiancheggiante il pri-miRNA

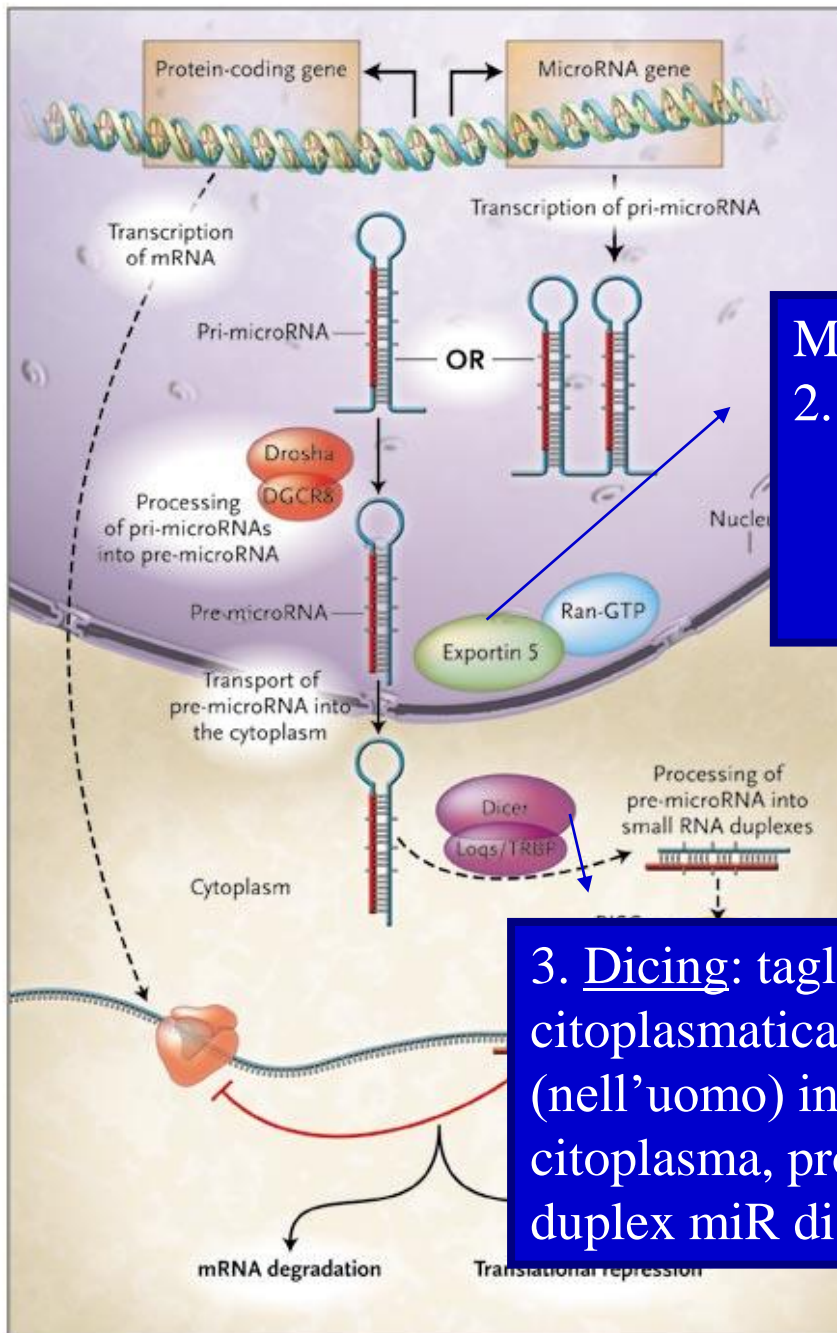
Proteine associate a Drosha conferiscono specificità (es. DGCR8)

In seguito al cropping grazie all'azione di Drosha si libera il **pre-miRNA**:

- composto da 80 nt
- ha una struttura a stem-loop
- presenta un 5'P e un 3'OH
- 2-3 nt all'estremità 3'OH sporgente a singola elica



# Biogenesi dei miRNA -2



Maturazione dei miRNA: 3 fasi:

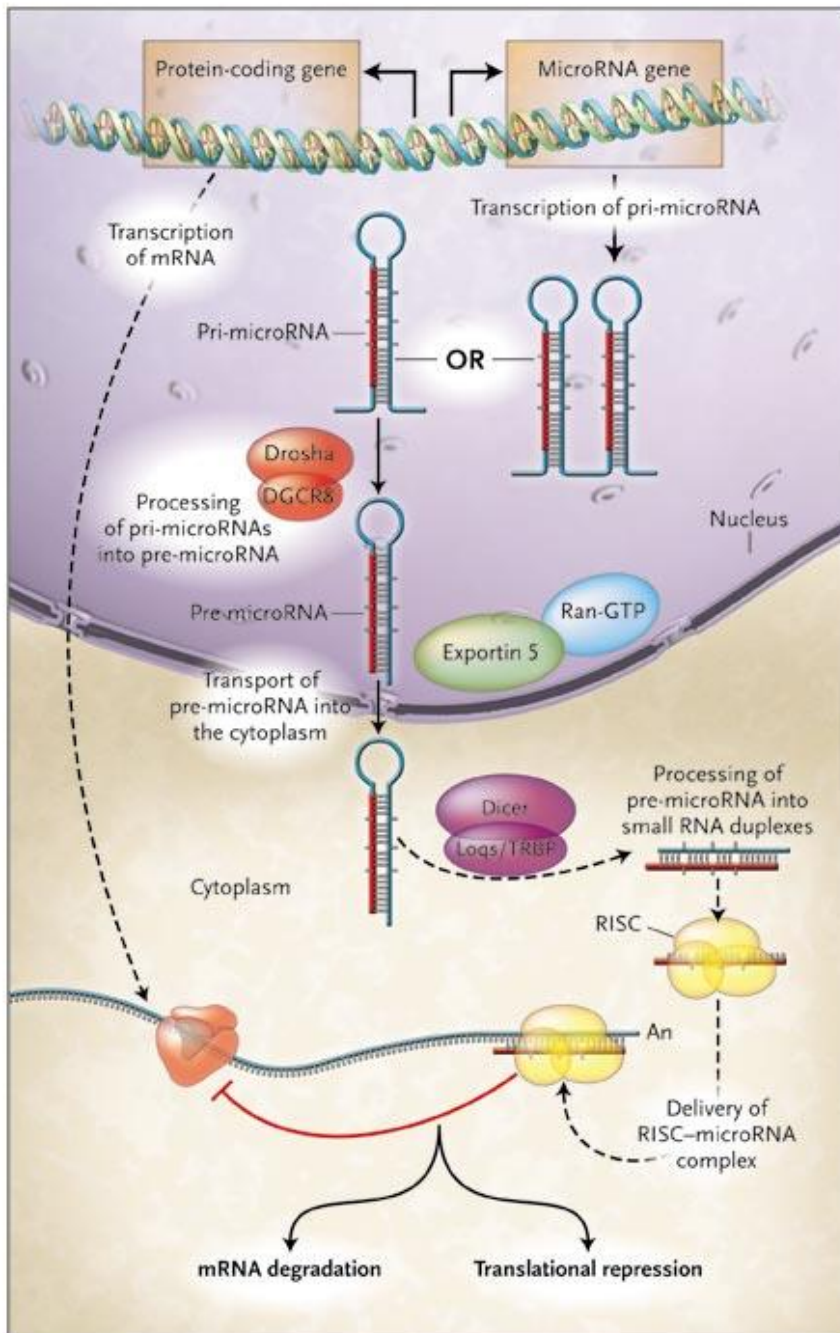
2. Export: il pre-miRNA viene trasportato nel citoplasma da Exportin5/RanGTP; si forma un eterotrimerico che passa attraverso i pori nucleari

3. Dicing: taglio di Dicer: una RNase III citoplasmatica chiamata Dicer che (nell'uomo) insieme al suo partner TR, nel citoplasma, processa il pre-miRNA in un duplex miR di 18-22 nt





# Biogenesi dei miRNA -3



In alcuni casi una delle 2 strand del duplex viene degradata, mentre l'altra si accumula come miRNA maturo.

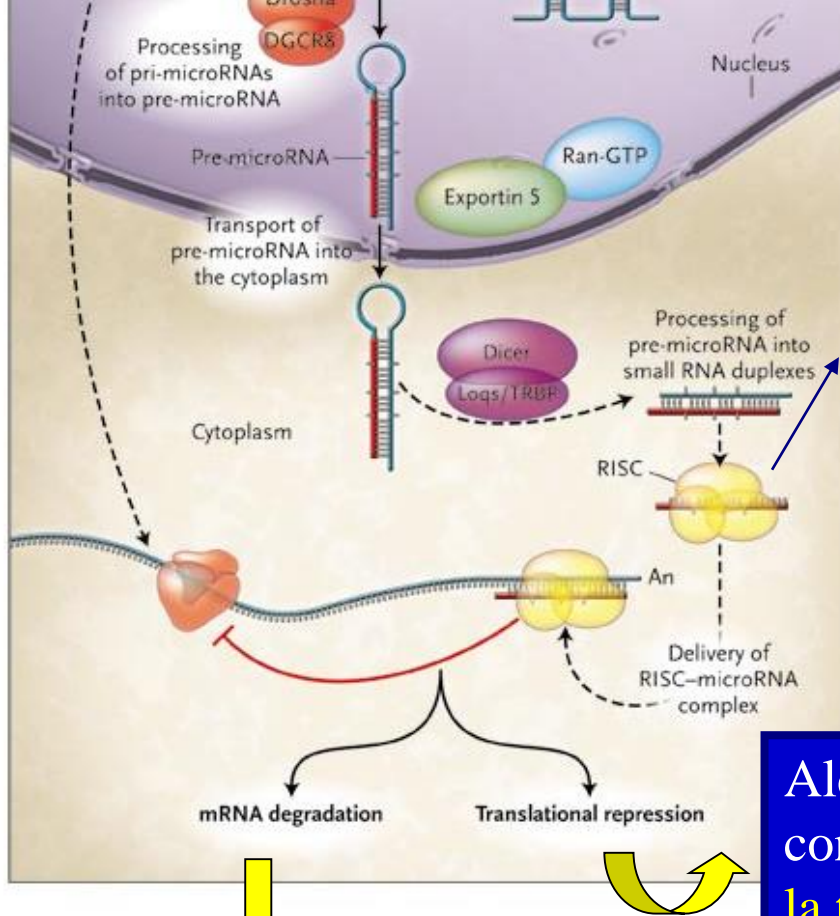
In altri casi funzionano entrambi da mir e la strand meno rappresentata era indicata con un \*.

Ora si è visto che entrambi possono essere miR e con target diversi, perciò ora sono chiamati invece che con l'asterisco: 5p e 3p.



# MiRNA in azione: RISC e inibizione del gene target

Dal duplex prodotto da Dicer il miRNA entra nel complesso effettore proteico, il **RISC**: complesso di silenziamento indotto da RNA o miRgonauta, che media la degradazione o l'inibizione della traduzione dell'mRNA del gene target



Alcuni miRNA appaiono imperfettamente con il 3'UTR dell'mRNA target e **inibiscono la traduzione** (produzione della proteina)

Altri miRNA mostrano una complementarità precisa al loro target e portano alla **degradazione dell'mRNA**

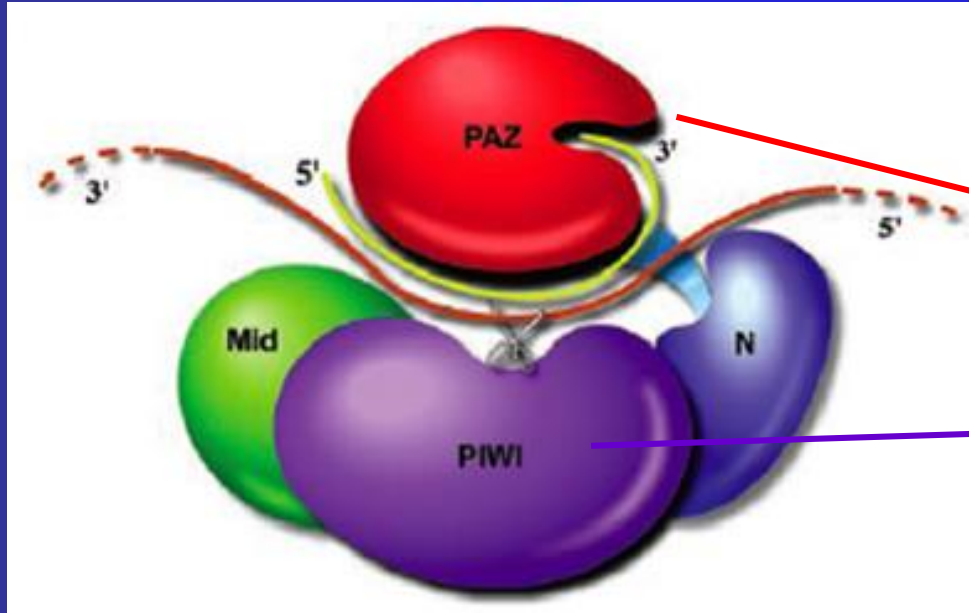


Le proteine componenti del RISC non sono state tutte identificate, alcune sono della famiglia proteica Argonaute (Ago)...



## Proteine Argonaute (AGO):

Famiglia di proteine essenziali nel processo di RNA interference (RNAi). Sono in grado di formare complessi ribonucleoproteici con i siRNA o i miRNA, che riconoscono per complementarità sequenze omologhe presenti in mRNA bersaglio



Le proteine AGO:  
due domini caratteristici:

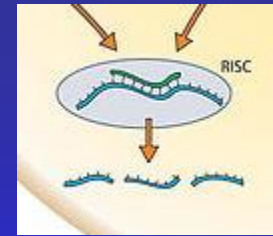
1. dominio **PAZ** lega il 3'-OH del piccolo RNA
2. dominio **Piwi** riconosce il terminale 5'-P del piccolo RNA ed ha attività endonucleasica

La proteina AGO2 insieme ad altre proteine forma un complesso multiproteico chiamato **RISC** (RNA-induced silencing complex) che possiede attività endonucleasica ed è capace di degradare in maniera specifica un RNA bersaglio contenente sequenze complementari alla sequenza guida del siRNA o miRNA

Nell'uomo sono stati identificati 8 membri della famiglia AGO. Tuttavia si conosce bene solo la funzione enzimatica della proteina AGO2.



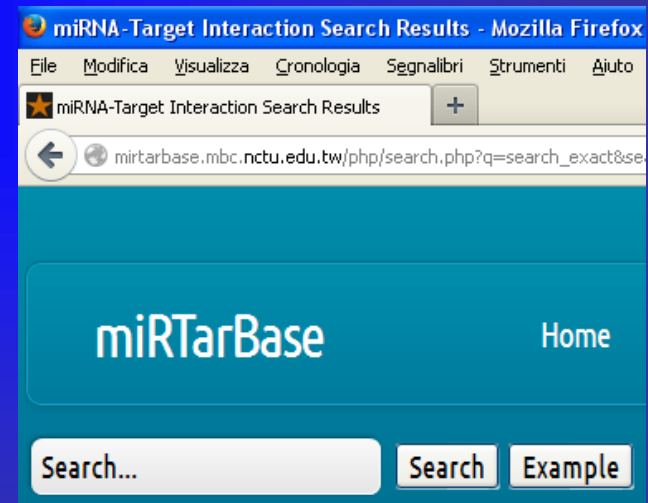
# Target



La più importante caratterizzazione della funzione dei miRNA è l'identificazione dei mRNA bersaglio

Poiché la complementarità tra miRNA e mRNA target non è perfetta molto probabilmente ciascun miRNA può regolare un ampio numero di geni  
Sono stati sviluppati molti algoritmi per predire i geni bersaglio:

MiRTarBase  
Diana-microT  
miRanda  
MICRORNA.ORG  
MIRDB  
RNA22-HSA  
TARGETMINER  
TARGETSCAN-VERT  
PICTAR-VERT



Ma ogni bersaglio predetto deve essere validato in laboratorio!

# Target

miRNA-Target Interaction Search Results - Mozilla Firefox

File Modifica Visualizza Cronologia Segnalibri Strumenti Aiuto

miRNA-Target Interaction Search Results

mirtarbase.mbc.ntu.edu.tw/php/search.php?q=search\_exact&se.hword=hsa-miR-17-5p

mirbase

Page 1 of 11 1 2 3 ... 11 Next >

**miRTarBase** Home

Search... Search Example

ID	Species (miRNA)	Species (Target)	miRNA	Target	Validation methods						Sum	# of papers	
					Strong evidence			Less strong evidence					
					Reporter assay	Western blot	qPCR	Microarray	NGS	pSILAC			Other
<a href="#">MIRT000256</a>	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-17-5p	ZNFX1	✓				✓		✓	3	2
<a href="#">MIRT000257</a>	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-17-5p	CCL1	✓						✓	2	1
<a href="#">MIRT000258</a>	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-17-5p	GPR137B	✓						✓	2	1
<a href="#">MIRT000259</a>	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-17-5p	NABP1	✓						✓	2	1
<a href="#">MIRT000261</a>	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-17-5p	NPAT	✓						✓	2	1
<a href="#">MIRT000263</a>	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-17-5p	YES1	✓						✓	2	1
<a href="#">MIRT000482</a>	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-17-5p	JAK1	✓	✓					✓	3	2

## Target

miRTarBase

Home

Search...

Search

Example

ID	Species (miRNA)	Species (Target)	miRNA	Target	Validation methods						Sum	# of papers	
					Strong evidence			Less strong evidence					
					Reporter assay	Western blot	qPCR	Microarray	NGS	pSILAC			Other
<a href="#">MIRT035908</a>	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	FAM200B					✓			1	1
<a href="#">MIRT035910</a>	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	SYNRG					✓			1	1
<a href="#">MIRT035911</a>	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	KLC4					✓			1	1
<a href="#">MIRT035912</a>	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	FUT7					✓			1	1
<a href="#">MIRT035913</a>	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	TRAP1					✓			1	1
<a href="#">MIRT035914</a>	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	RFWD2					✓			1	1
<a href="#">MIRT035915</a>	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	STIP1					✓			1	1
<a href="#">MIRT035916</a>	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	C16orf62					✓			1	1
<a href="#">MIRT035917</a>	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	THOC2					✓			1	1
<a href="#">MIRT035918</a>	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	BAZZA					✓			1	1
<a href="#">MIRT035919</a>	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	HPS4					✓			1	1
<a href="#">MIRT035920</a>	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	GNB2L1					✓			1	1
<a href="#">MIRT035921</a>	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	PSMD1					✓			1	1
<a href="#">MIRT035922</a>	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	BAMBI					✓			1	1
<a href="#">MIRT035923</a>	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	HIST1H2BK					✓			1	1
<a href="#">MIRT035924</a>	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	TBX1					✓			1	1
<a href="#">MIRT035925</a>	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	EZR					✓			1	1
<a href="#">MIRT035926</a>	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	USP9X					✓			1	1
<a href="#">MIRT035927</a>	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-1180-3p	TAF3					✓			1	1

# MiRNA: funzioni negli stati di normalità

Poiché si scoprono miRNA nuovi tutti i giorni è evidente che questi piccoli geni potrebbero essere coinvolti nella normale omeostasi cellulare

I miRNA partecipano a processi biologici essenziali:

- proliferazione cellulare
- destino della linea B ematopoietica
- pattern del cervello
- secrezione di insulina dalle cellule del pancreas
- sviluppo degli adipociti
- meccanismi biologici coinvolti nell'embriogenesi

.....

- Ma anche nello sviluppo di diverse patologie...

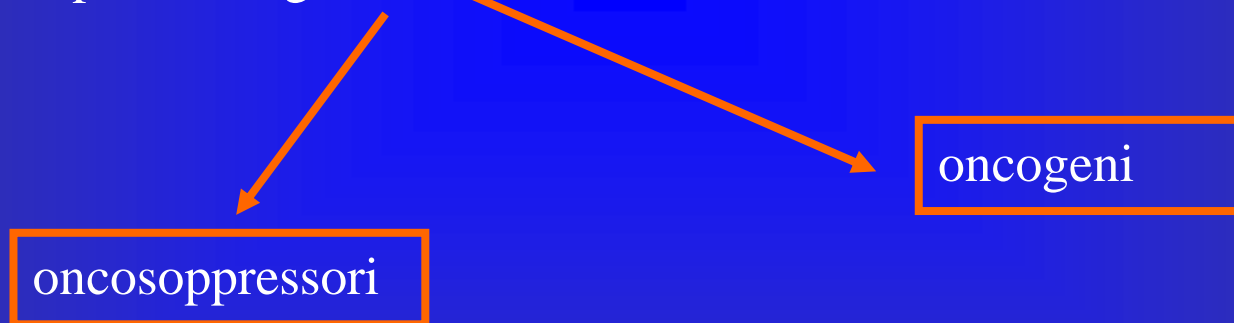


# MiRNA: funzioni negli stati di malattia

Poichè i miRNA partecipano a molte normali funzioni ci si è chiesto se anomalie nei miRNA potessero avere importanza in alcune malattie.

Infatti i miRNA sono stati visti coinvolti in molte malattie

I miRNA possono agire sia



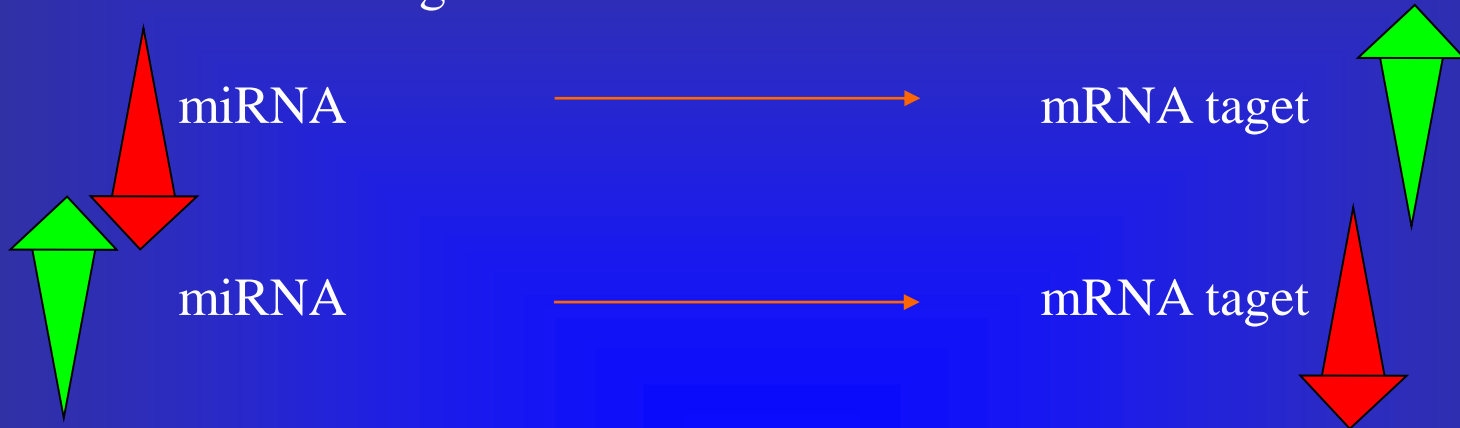
Sono stati dimostrati meccanismi di inattivazione o attivazione di determinati miRNA.





# MiRNA: funzioni negli stati di malattia

L'effetto finale della disregolazione di miRNA:



Nel caso di inattivazione di un miRNA si avrà la sovraespressione dell'mRNA bersaglio mentre l'attivazione di un miRNA porterà alla down-regolazione dell'mRNA target che potrebbe essere coinvolto in:

Apoptosi  
Ciclo cellulare  
Invasione  
Angiogenesi

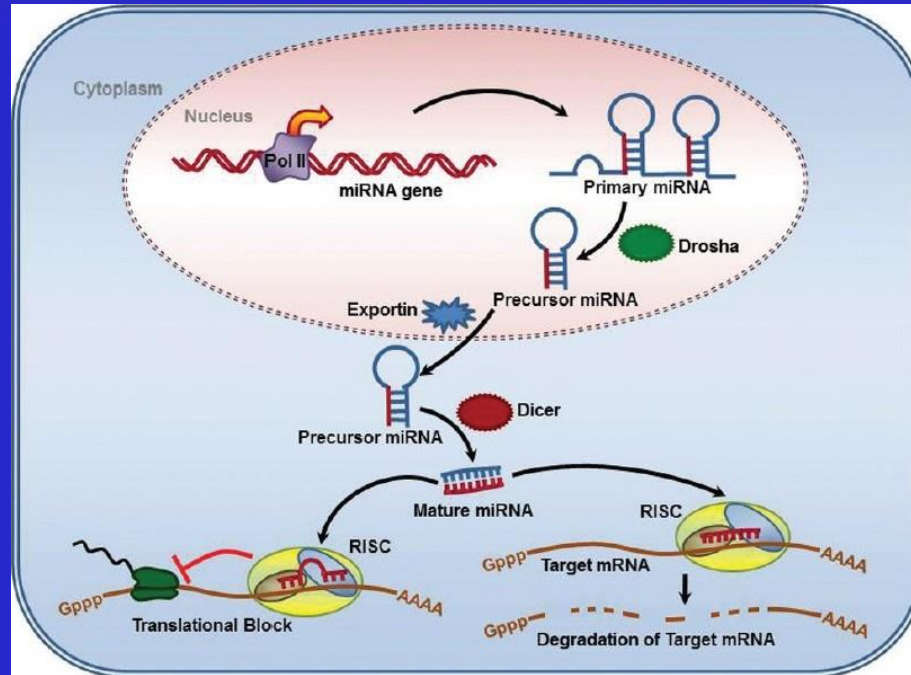
Quindi la disregolazione dell'espressione dei miRNA intracellulari è stata associata a molte condizioni patologiche.



# Interazioni miRNA-mRNA con importanza per il cancro

MiRNA	Azione nel cancro	Referenza
famiglia miRNA let-7	Regola gli oncogeni RAS: Let-7 ha una bassa espressione nei <u>tumori del polmone</u> rispetto al polmone normale e la proteina RAS ha una variazione inversa	Johnson 2005
Cluster mir-17-92	L'aumento di espressione insieme a c-myc, accelera lo sviluppo tumorale in un modello di <u>linfoma delle cellule B del topo</u>	He 2005
Cluster mir-17-92: miR-17-5p miR-20a	Regolano negativamente il fattore di trascrizione E2F1, un gene che funziona come un soppressore del <u>tumore</u>	O'Donnel 2005
mir-189	Coinvolto nella <u>sindrome di Tourette (TS)</u> , una patologia neurologica: il mir-189 potrebbe influenzare l'espressione del gene SLITRK1	Abelson 2006
Mir-221 Mir-222 Mir-146	Sono overespressi nel <u>tumore della tiroide</u> e interagiscono con l'oncogene c-KIT	He 2005

# Non solo MicroRNA cellulari.....



... ma anche.....



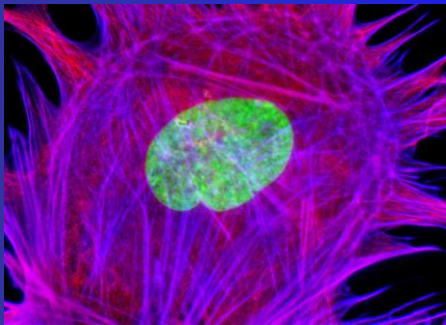
## MiRNA circolanti



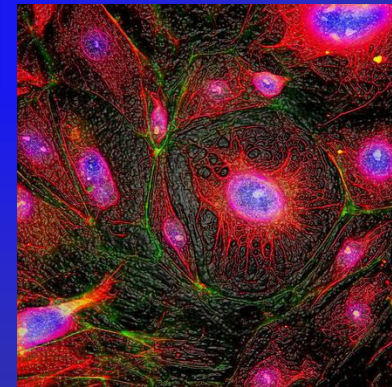
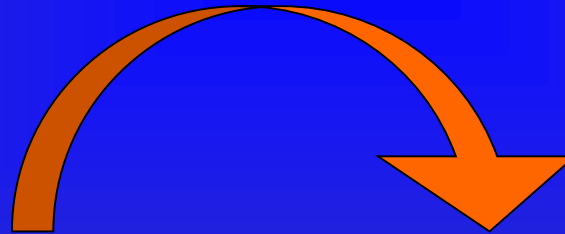
I miRNA possono essere trasportati al di fuori delle cellule e forse possono essere usati come indici diagnostici extracellulari per la diagnosi e la terapia di alcune patologie.

I miRNA circolanti nei fluidi biologici, miRNA extracellulari, rappresentano una nuova forma di comunicazione intercellulare attraverso

il trasferimento di informazioni genetiche



da una cellula donatrice

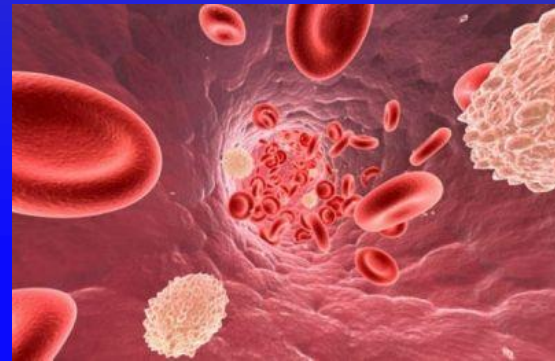


a una cellula accettrice

# MiRNA circolanti

Quando sono stati individuati dei miRNA extracellulari come biomarkers di patologie è divenuto evidente che i miRNA possono essere esportati dalle cellule e si trovano in molti fluidi biologici come:

- Plasma
- Siero
- Saliva
- Urine
- Lacrime
- Latte materno



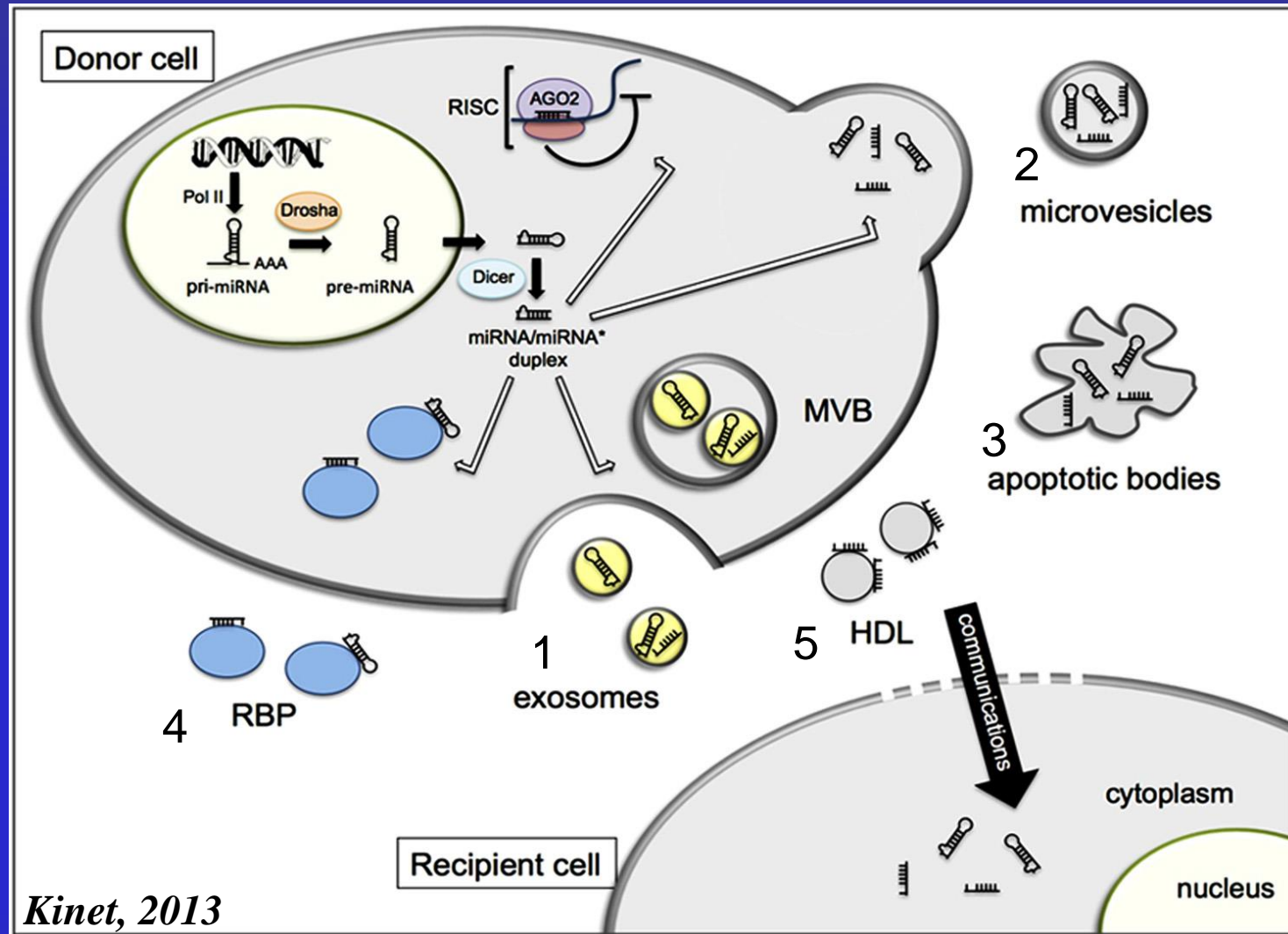
I miRNA extracellulari sono inaspettatamente stabili e devono essere protetti dalla degradazione, poiché l'RNA nudo è prontamente bersagliato dalle esonucleasi che sono abbondantemente presenti in molti fluidi extracellulari. Quindi i miRNA sono impacchettati grazie a 5 diversi meccanismi:

1. Esosomi
2. micro-vescicole o micro-vescicole di distacco (SMVs)
3. corpi apoptotici
4. proteine che legano l'RNA
5. HDL



# MiRNA circolanti

Il miRNA una volta maturo può essere incorporato nel RISC e appaiare con il suo mRNA target e reprimerne la traduzione o indurre la sua degradazione.



*Kinet, 2013*

Oppure il miRNA maturo può essere esportato fuori dalla cellula e trasportato da 5 diversi carrier. Infine i miRNA extracellulari possono essere trasferiti a cellule riceventi dove possono alterare l'espressione genica.

# Carrier dei MiRNA circolanti

## 1. ESOSOMI:

Micro-vescicole extracellulari piccole (40-120 nm) che si originano da corpi multi-vescicolari (MVBs) e sono rilasciate tramite esocitosi di questi MVBs.

Prodotti da molti tipi di cellule:

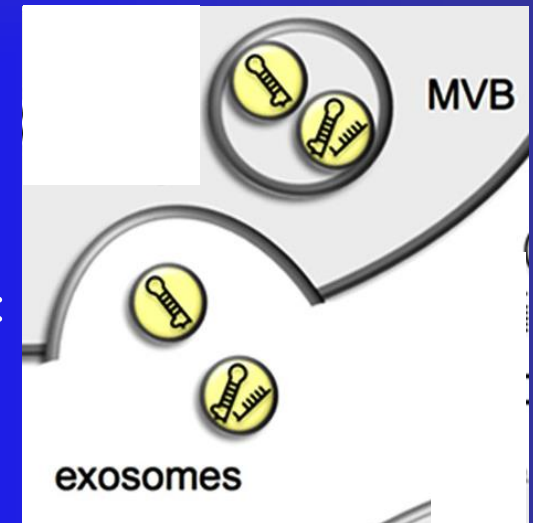
- Epiteliali
- Ematopoietiche
- Endoteliali
- Tumoriali

Gli esosomi sono stati identificati in molti fluidi circolanti:

- Plasma
- Urine
- Latte
- Saliva
- Sperma

L'interesse nella biologia degli esosomi è aumentata in seguito alla dimostrazione che essi possono servire da carrier dei miRNA

Processi di selezione devono avere luogo per caricare i miRNA negli esosomi: probabilmente esistono meccanismi cellulari che attivamente concentrano specifiche specie di miRNA negli esosomi



# Carrier dei MiRNA circolanti

## 2. MICRO-VESCICOLE

O MICRO-VESCICOLE DI DISTACCAMENTO (SMVS):

sono un'altra forma di vescicole piccole e definite che si distaccano dalla membrana plasmatica di una grande varietà di cellule

Dimensioni: 0.1-1  $\mu\text{m}$ : sono più grandi degli esosomi e il loro meccanismo di produzione è diverso

Mentre gli esosomi sono prodotti da una fusione esocitotica di MVBs, le microvescicole sono prodotte da una germogliazione di vescicole dalla membrana plasmatica



La presenza di miRNA nelle micro-vescicole è descritta dal 2008.





# Carrier dei MiRNA circolanti

## 3. CORPI APOPTOTICI o vescichette apoptotiche

Le cellule apoptotiche o che stanno morendo rilasciano vescicole di membrana nell'ambiente extracellulare.

Sono grandi particelle (1-5  $\mu\text{m}$ ) con forma eterogenea.



Per esempio è stato dimostrato che nell'Aterosclerosi: le cellule endoteliali producono corpi apoptotici ricchi di mir-126. Questo porta le cellule accettrici a produrre una chemochina che limita l'aterosclerosi e conferisce stabilità alle placche



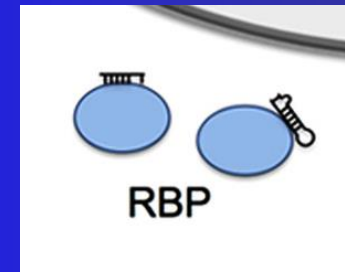
# Carrier dei MiRNA circolanti

## 4. PROTEINE CHE LEGANO L'RNA

una significativa frazione di miRNA extracellulari è associata a proteine che legano l'RNA e che li proteggono dalla degradazione:

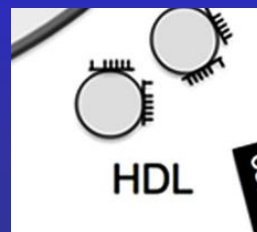
Es:

- NPM1: nucleofosmina
- Proteine della famiglia delle Argonaute:  
Ago2, 1, 3, 4 (ma alcuni studi sono in disaccordo)



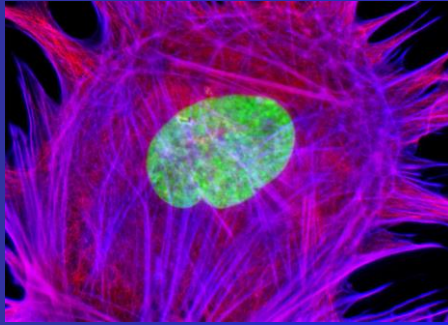
## 5. HDL

i miRNA extracellulari possono essere trasportati anche dalle HDL. Mentre le vescicole di trasporto sono composte da un doppio strato fosfolipidico, le lipoproteine hanno un singolo strato di lipidi.

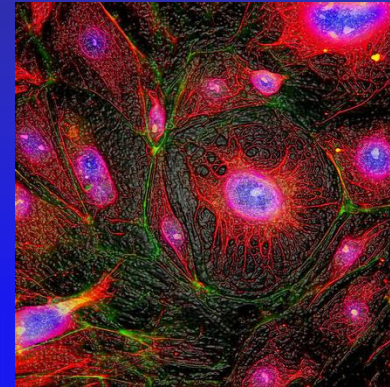
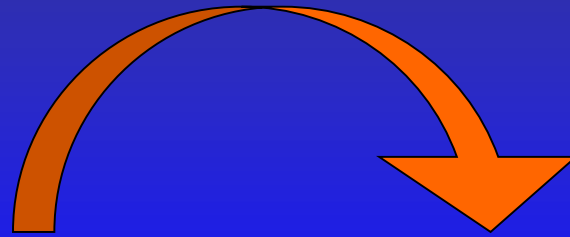


# MiRNA circolanti nella comunicazione cellula-cellula

il trasferimento di informazioni genetiche



da una cellula donatrice



a una cellula accettrice

Questa forma di trasferimento tra cellule è di rilevanza funzionale esercitando silenziamento genico nelle cellule riceventi

Questa può spiegare

come cellule adiacenti  
all'interno di un organo  
possano comunicare

come un miRNA possa influenzare  
un tipo cellulare o un tessuto in cui  
esso non viene prodotto

Questa forma di comunicazione è coinvolta:  
nella regolazione dell'immunità (*Mittelbrunn, 2011*)  
nella migrazione cellulare (*Zhang, 2010*)  
nello sviluppo dei tumori (*Yang, 2011*)

# MiRNA circolanti come marcatori diagnostici

Sulla base della scoperta che i microRNA circolano nel sangue, è stata fatta l'ipotesi che essi abbiano, un ruolo di biomarcatori associati allo sviluppo di patologie

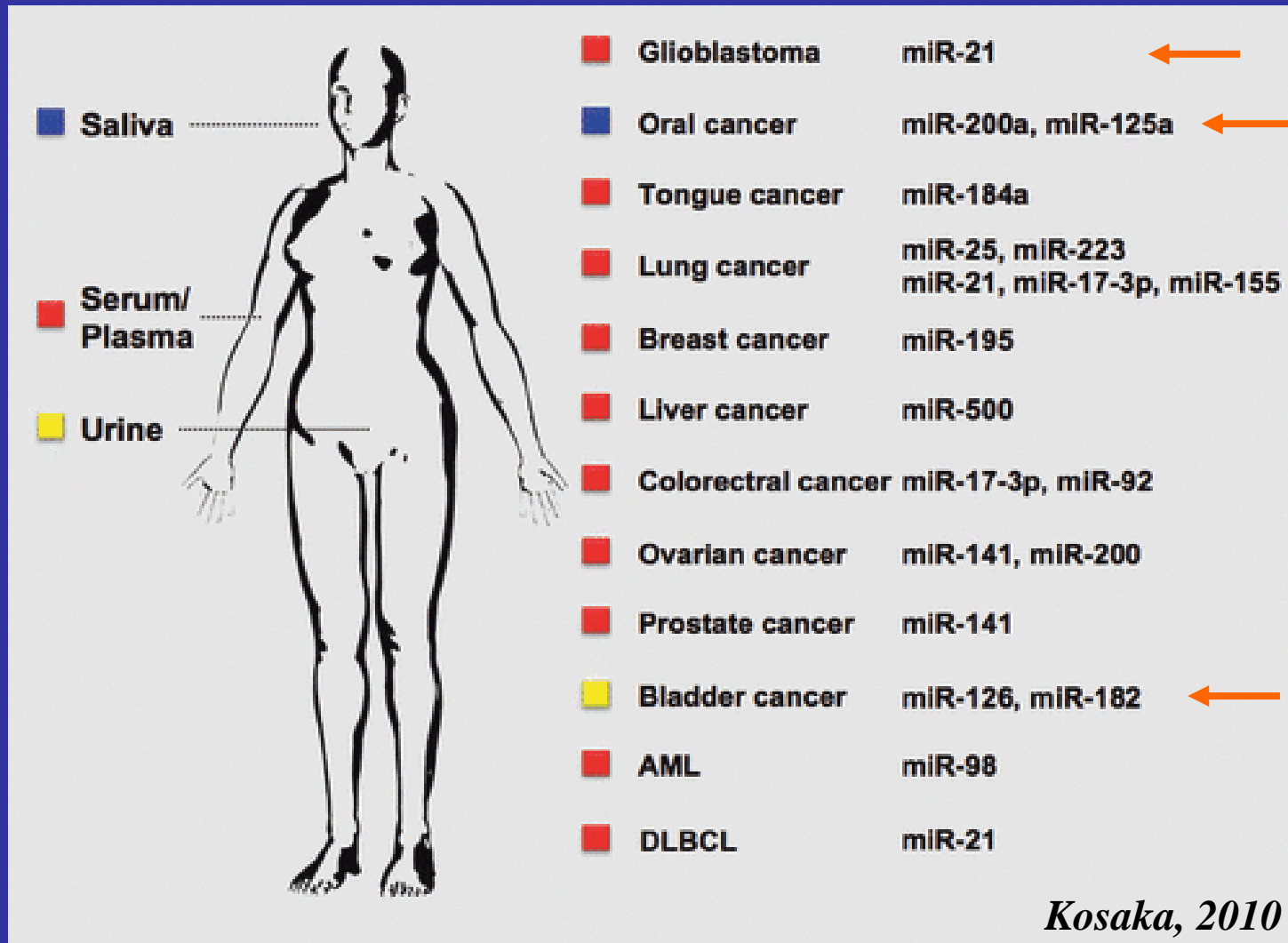


miRNAs nei fluidi del corpo umano sono  
marcatori diagnostici tumorali  
non invasivi

Molti tipi di miRNA circolanti sono stati riportati in molti tipi di cancro. In alcuni casi, miRNA circolanti in siero, saliva ed urina sono buoni candidati per un futuro utilizzo

Tuttavia alcuni tipi di cancro non possono essere diagnosticati conoscendo i biomarcatori sierici.

# MiRNA circolanti come marcatori diagnostici



AML:

acute myeloid  
leukemia

DLBCL: diffuse  
large B-cell  
lymphoma

*Kosaka, 2010*

Qui sono riassunte ricerche recenti che mostrano l'esistenza di **miRNA circolanti** nel fluidi di pazienti con il cancro

# MiRNA circolanti come marcatori diagnostici - 1

Type of cancer	Biomarker candidate	Reference
Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)	Expression levels of <b>miR-155</b> , <b>miR-210</b> and <b>miR-21</b> were higher in DLBCL patient than control sera	Lawriw, 2008
	High <b>miR-21</b> expression was associated with relapse-free survival	
Prostate cancer	Serum levels of <b>miR-141</b> can distinguish patients with prostate cancer from healthy controls	Mitchell, 2008
Ovarian cancer	The levels of the <b>8 specific miRNAs</b> were similar between cellular and exosomal miRNAs. Exosomal miRNA from ovarian cancer patients exhibited similar profiles, which were significantly distinct from profiles observed in benign disease	Taylor, 2008
	<b>miR-21</b> , <b>-92</b> , <b>-93</b> , <b>-126</b> and <b>-29a</b> were significantly overexpressed in the serum from cancer patients compared to controls	Resnick, 2009
Non small cell lung cancer	<b>Eleven serum miRNAs</b> were found to be altered more than 5-fold between longer-survival and shorter-survival groups, and levels of four miRNAs were significantly associated with overall survival	Hu, 2010
Acute myeloid leukemia (AML) Acute lymphoblastic leukemia (ALL)	<b>miR-92a</b> decreased in the plasmas of acute leukemia patients	Tanaka 2009
Breast cancer	Increased <b>miR-195</b> levels in patients were reflected in tumors, and circulating levels of <b>miR-195</b> and <b>let-7a</b> decreased in cancer patients postoperatively, to levels comparable with control subjects	Heneghan, 2010
	<b>miR-155</b> was differentially expressed in the serum of women with hormone-sensitive compared to women with hormone-insensitive breast cancer	Zhu, 2009
Gastric cancer	The plasma concentrations of <b>miR-17-5p</b> , <b>miR-21</b> , <b>miR-106a</b> , and <b>miR-106b</b> were significantly higher in patients than controls, whereas <b>let-7a</b> was lower in patients	Tsujiura, 2010
Pancreatic cancer	Circulating <b>miR-210</b> levels are elevated in pancreatic cancer patients	Ho, 2010
Pancreatic ductal adenocarcinoma	The combined analyses of four miRNAs ( <b>miR-21</b> , <b>miR-210</b> , <b>miR-155</b> , and <b>miR-196a</b> ) in plasma can discriminate patients from normal healthy individuals	Wang, 2009
Squamous cell carcinoma (SCC) of tongue	Plasma <b>miR-184</b> levels were significantly higher in tongue SCC patients in comparison with normal individuals, and the levels were significantly reduced after surgical removal of the primary tumors	Wong, 2008
Colorectal cancer	Both <b>miR-17-3p</b> and <b>miR-92</b> were significantly elevated in the patients, and the plasma levels of these miRNAs were reduced after surgery	Ng, 2009
Hepatocellular carcinoma (HCC)	An increased amount of <b>miR-500</b> was found in the sera of the HCC patients, and its levels in sera returned to normal after the surgical treatment	Yamamoto, 2009

# MiRNA circolanti come marcatori diagnostici - 2

Patologia	Biomarker candidato	Ref.
Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)	I livelli di espressione nel siero di <u>miR-155</u> , <u>miR-210</u> and <u>miR-21</u> sono più alti nei pazienti rispetto ai controlli	Lawriw, 2008
	L'elevata espressione di <u>miR-21</u> è associata con la sopravvivenza priva di ricidive	
Prostate cancer	I livelli sierici di <u>miR-141</u> possono distinguere i pazienti con il cancro alla prostata dai controlli sani	Mitchell, 2008
Ovarian cancer	<u>miR-21</u> , <u>-92</u> , <u>-93</u> , <u>-126</u> and <u>-29a</u> sono sovraespressi nel siero delle pazienti rispetto ai controlli	Resnick, 2009

# MiRNA circolanti come marcatori diagnostici - 3

Patologia	Biomarker candidato	Ref.
Non small cell lung cancer	11 miRNA sierici sono stati trovati alterati di oltre 5 volte tra il gruppo dei longer-survival rispetto a quello dei shorter-survival, e i livelli di 4 miRNA sono associati con la sopravvivenza globale	Hu, 2010
Acute myeloid leukemia (AML) e Acute lymphoblastic leukemia (ALL)	<u>miR-92a</u> decresce nel plasma dei pazienti affetti da leucemia cronica	Tanaka 2009
Breast cancer	Nel tumore si è visto l'aumento dei livelli di <u>miR-195</u> e i livelli dello stesso mir e di <u>let-7a</u> nel sangue diminuisce nelle pazienti dopo l'operazione fino a livelli simili ai controlli sani	Henegha, 2010
	Il <u>miR-155</u> è differenzialmente espresso nel siero di donne con cancro al seno ormone-responsivo rispetto a quelle ormone-non-resp	Zhu, 2009



# MiRNA circolanti come marcatori diagnostici - 4

Patologia	Biomarker candidato	Ref.
Gastric cancer	Le concentrazioni plasmatiche di <u>miR-17-5p</u> , <u>miR-21</u> , <u>miR-106a</u> e <u>miR-106b</u> sono significativamente più elevate nei pazienti rispetto ai controlli, mentre <u>let-7a</u> è più basso nei pazienti	Tsujiura, 2010
Pancreatic cancer	I livelli di <u>miR-210</u> circolante sono elevati nei pazienti	Ho, 2010
Pancreatic ductal adenocarcinoma	L'analisi combinata di 4 miRNA ( <u>miR-21</u> , <u>miR-210</u> , <u>miR-155</u> e <u>miR-196a</u> ) nel plasma può discriminare i pazienti dai controlli sani	Wang, 2009
Squamous cell carcinoma (SCC) of tongue	I livelli plasmatici di <u>miR-184</u> : -sono significativamente elevati nella lingua dei pazienti SCC rispetto ai normali e -sono significativamente ridotti dopo la rimozione chirurgica del tumore primario	Wong, 2008

# MiRNA circolanti come marcatori diagnostici - 5

Patologia	Biomarker candidato	Ref.
Colorectal cancer	Sia il <u>miR-17-3p</u> che il <u>miR-92</u> sono significativamente elevati nei pazienti e i livelli plasmatici di questi 2 mir sono ridotti dopo l'intervento chirurgico	Ng, 2009
Hepatocellular carcinoma (HCC)	Un aumento della quantità di <u>miR-500</u> è stata trovata in sieri di pazienti HCC e il suo livello nel siero ritorna normale dopo trattamento chirurgico	Yamamoto, 2009

# Esempio di uno studio sui miRNA e i loro target

*Mol Cancer Res*; 9(8); 1100–11. ©2011 AACR.

**DNA Damage and Cellular Stress Responses**

**Molecular  
Cancer  
Research**

## **MicroRNA-138 Modulates DNA Damage Response by Repressing Histone H2AX Expression**

Yemin Wang<sup>1,2,3</sup>, Jen-Wei Huang<sup>1,2,3,6</sup>, Ming Li<sup>7</sup>, Webster K. Cavenee<sup>7</sup>, Patrick S. Mitchell<sup>1,4,6</sup>, Xiaofeng Zhou<sup>8</sup>, Muneesh Tewari<sup>2,3,5</sup>, Frank B. Fumari<sup>7</sup>, and Toshiyasu Taniguchi<sup>1,2,3</sup>

### **Abstract**

Precise regulation of DNA damage response is crucial for cellular survival after DNA damage, and its abrogation often results in genomic instability in cancer. Phosphorylated histone H2AX ( $\gamma$ H2AX) forms nuclear foci at sites of DNA damage and facilitates DNA damage response and repair. MicroRNAs (miRNA) are short, nonprotein-

*(Wang, 2011)*

# MiRNA che hanno come target geni coinvolti nella riparazione del DNA

MiRNA	3'UTR del gene target	Referenza
miR-421	ATM: enzima coinvolto nel mantenimento dell'integrità genomica	Hu et al., 2010
miR-100	ATM	Ng et al., 2010
miR-101	ATM, DNA-PK: fattore essenziale per la riparazione del DNA	Yan et al., 2010
miR-18a	ATM	Wu et al. 2013
miR-138	H2AX: istone	Wang et al., 2011
miR-210	RAD52: ricombinasi coinvolta nella riparazione del DNA	Crosby et al., 2009
miR-3248	Dicer	Chang et al., 2012
miR-185	ATR	Wang et al., 2013
miR-16	Wip1: fosfatasi oncogenica	Zhang et al., 2010
miR-25, miR-32	MDM2: principale inibitore di p53	Suh et al., 2012
miR-18b	MDM2	Dar et al., 2013
miR-661	MDM2	Hoffman et al., 2013
miR-96	REV1	Wang et al., 2012
.....	.....	.....

# I miRNA e i loro target

*Mol Cancer Res*; 9(8); 1100–11. ©2011 AACR.

**DNA Damage and Cellular Stress Responses**

**Molecular  
Cancer  
Research**

## MicroRNA-138 Modulates DNA Damage Response by Repressing Histone H2AX Expression

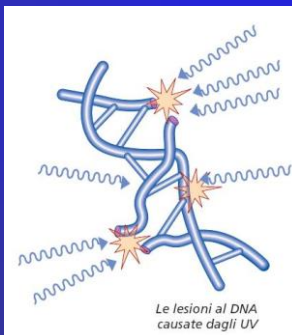
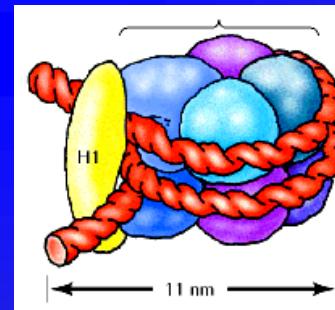
Yemin Wang<sup>1,2,3</sup>, Jen-Wei Huang<sup>1,2,3,6</sup>, Ming Li<sup>7</sup>, Webster K. Cavenee<sup>7</sup>, Patrick S. Mitchell<sup>1,4,6</sup>, Xiaofeng Zhou<sup>8</sup>, Muneesh Tewari<sup>2,3,5</sup>, Frank B. Fumari<sup>7</sup>, and Toshiyasu Taniguchi<sup>1,2,3</sup>

### Abstract

Precise regulation of DNA damage response is crucial for cellular survival after DNA damage, and its abrogation often results in genomic instability in cancer. Phosphorylated histone H2AX ( $\gamma$ H2AX) forms nuclear foci at sites of DNA damage and facilitates DNA damage response and repair. MicroRNAs (miRNA) are short, nonprotein-

Non si sa ancora come i miRNAs modulino la risposta al danno del DNA

L'istone fosforilato H2AX forma dei foci nucleari nei punti in cui il DNA è danneggiato e facilita la riparazione del DNA

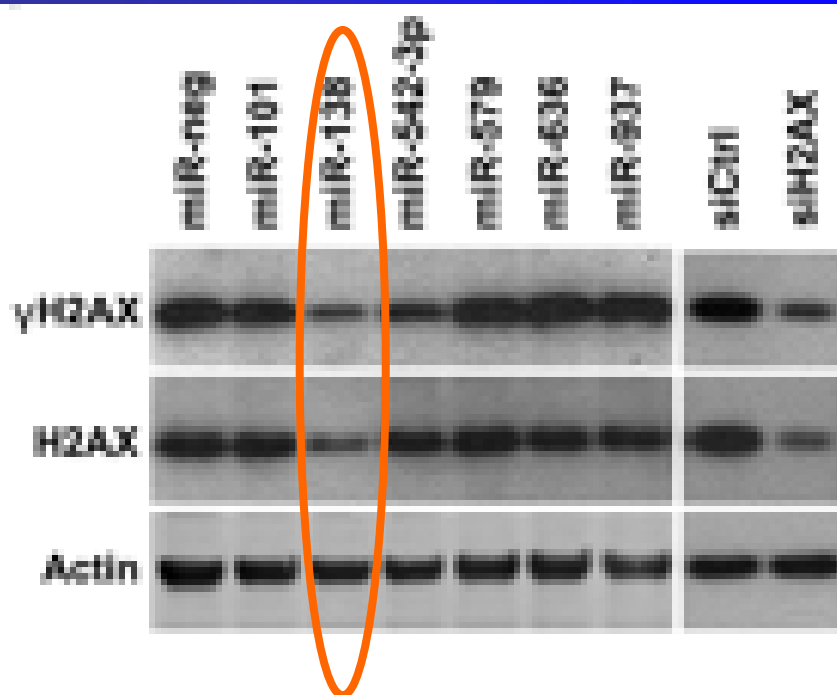
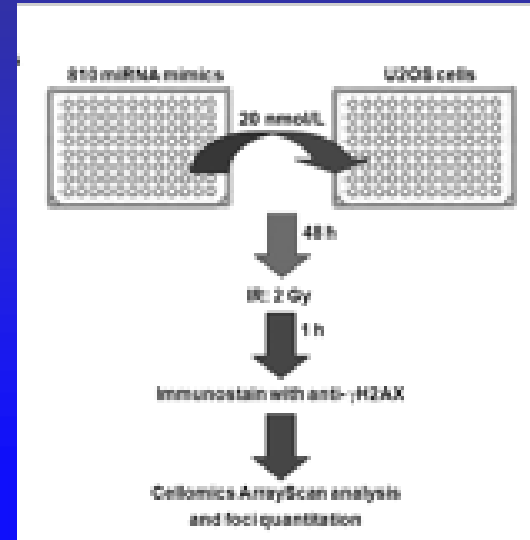


In questo studio, hanno sviluppato un test di screening basato sulle cellule e che utilizza la formazione di foci di H2AX indotta da radiazioni ionizzanti in una linea cellulare di osteosarcoma

(Wang, 2011)

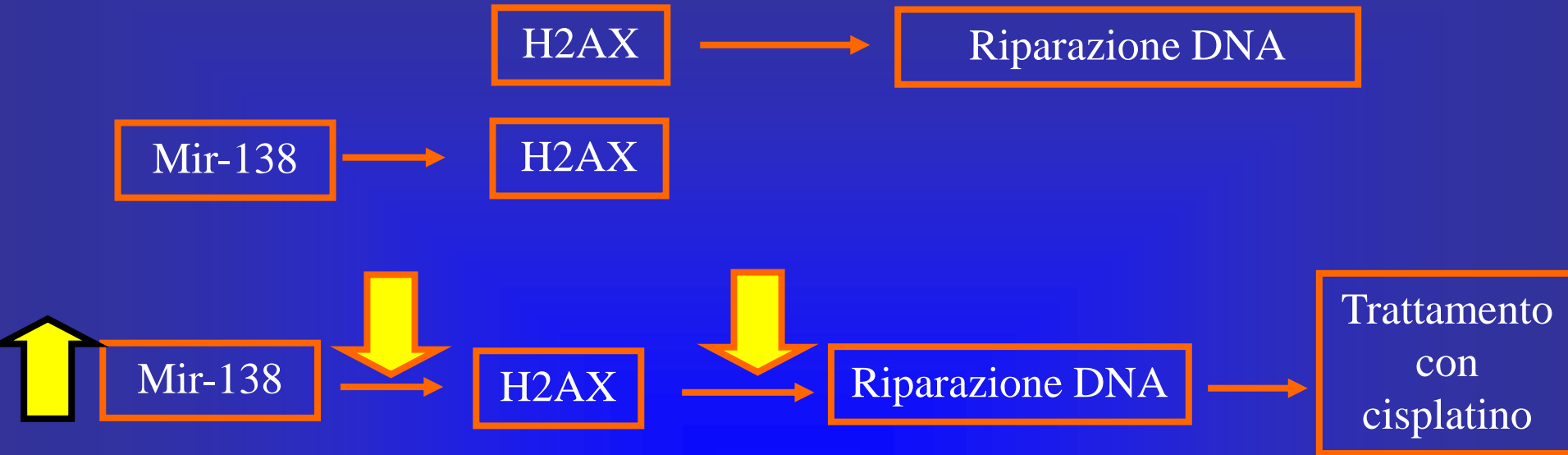
# I miRNA e i loro target

Attraverso lo screening di una libreria di miRNA umani, hanno identificato molti miRNA che inibiscono la formazione dei foci di H2AX.



Tra questi, il **miR-138** ha come suo target il 3'UTR di H2AX, riducendo l'espressione dell'istone H2AX e inducendo instabilità cromosomica dopo il danno al DNA.

# I miRNA e i loro target



La sovraespressione di miR-138 inibisce la ricombinazione omologa ed aumenta la sensibilità cellulare ad agenti multipli di danneggiamento cellulare (cisplatino, camptotecin, and IR).

La reintroduzione dell'istone H2AX in cellule che sovraesprimono il miR-138 attenua la sensibilizzazione mediata da miR-138 ai farmaci.



Questo studio suggerisce che il miR-138 sia un importante regolatore della stabilità genomica e che sia un potenziale agente terapeutico per aumentare l'efficacia di radioterapia e chemioterapia con agenti che danneggiano il DNA.

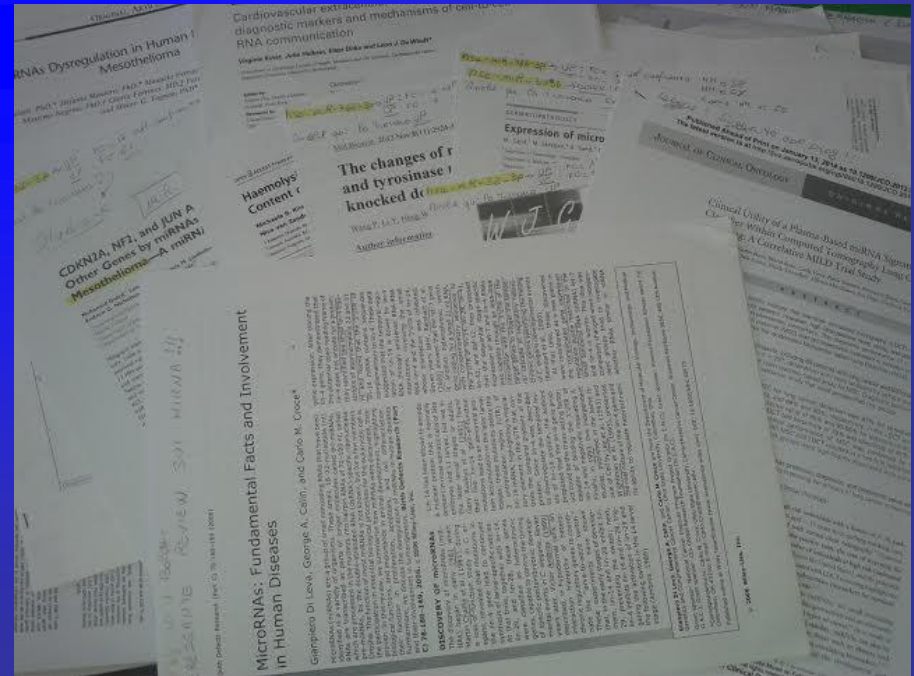
*(Wang, 2011)*

# Conclusioni: hot topic!!!

Facendo una ricerca su Pub-Med si trovano quasi 8000 articoli nel 2015 sui **miRNA**....

I miRNA sono una rivoluzione nella comprensione della biologia cellulare...

C'è ancora molto da lavorare..... e molto da leggere.....



*Grazie per l'attenzione!*



*Grazie per l'attenzione!*