



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea

SCIENZE BIOLOGICHE

Il ruolo delle regioni UTR degli mRNA nel Cancro

The Untranslated Regions of mRNAs in Cancer

Tesi di Laurea di:
di:

Giulia Cotoloni

Giulia Cotoloni

Docente Referente
Chiar.mo Prof.
Anna La Teana

Anna La Teana

Sessione Straordinaria

Anno Accademico 2019/2020



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea

SCIENZE BIOLOGICHE

Il ruolo delle regioni UTR degli mRNA nel cancro

Tesi di Laurea di:

Giulia Cotononi

Docente Referente

Chiar.mo Prof.

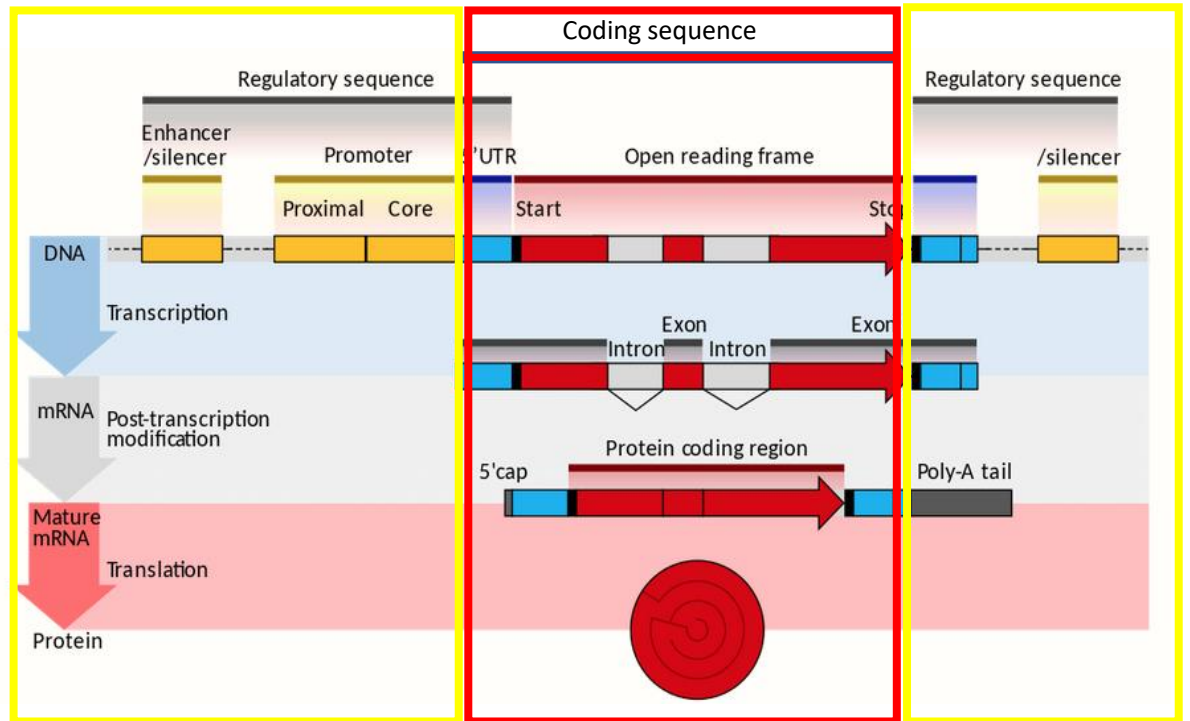
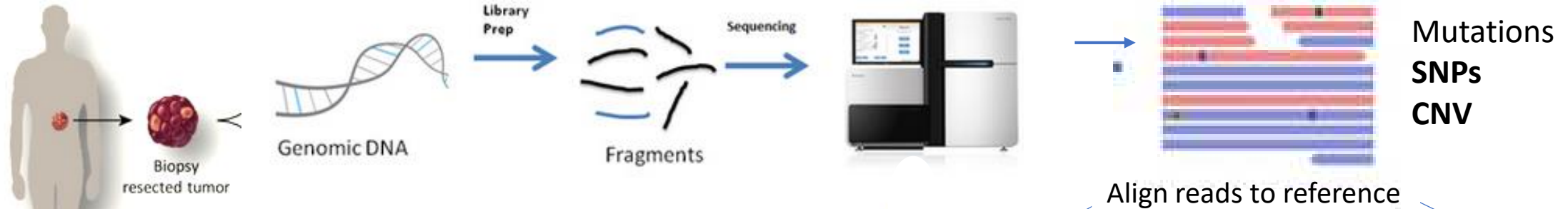
Anna La Teana

Sessione Straordinaria

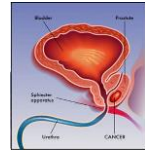
Anno Accademico 2019/2020

Il sequenziamento: lo start point per la diagnosi tumorale

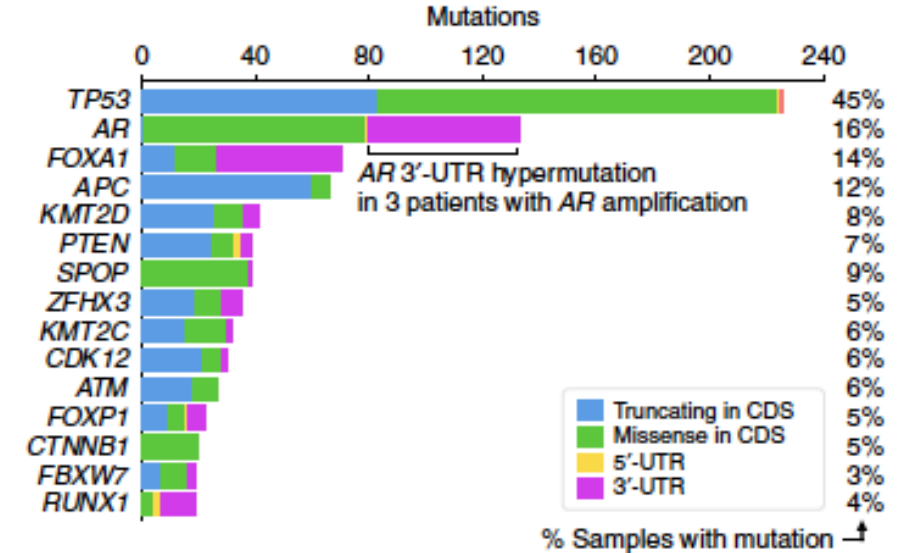
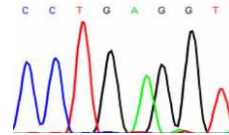
The International Cancer
Genome Consortium



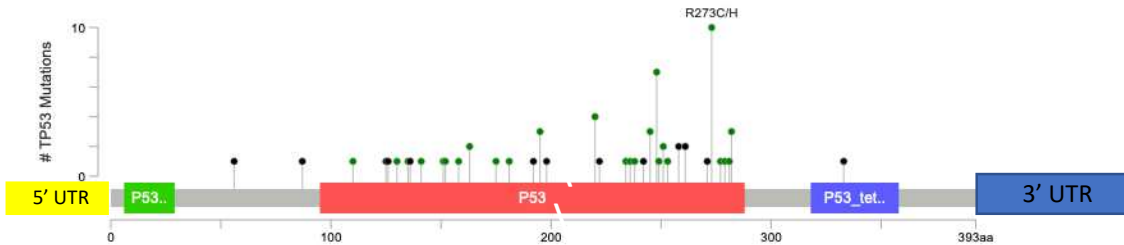
UTR e cancro: FOXA1 nell'adenocarcinoma prostatico



Prostate cancer



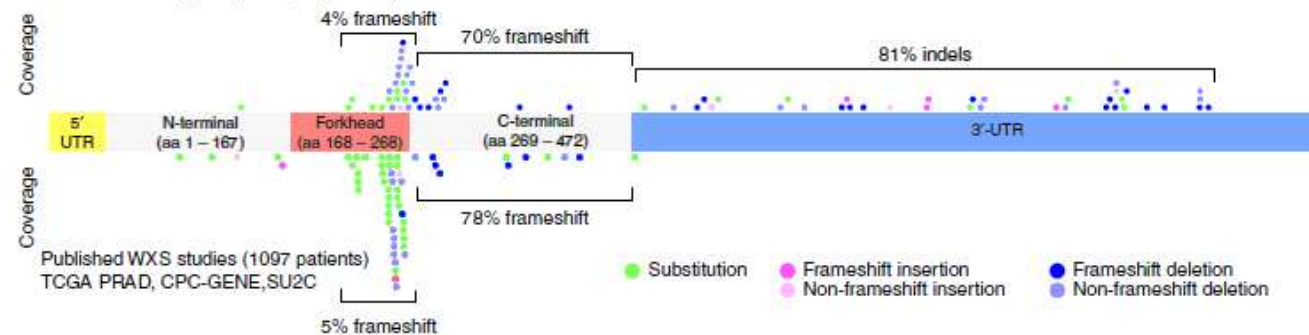
TP53: tumor suppressor



- **Missense Mutations**
- **Truncating Mutations:** Nonsense, Nonstop, Frameshift deletion, Frameshift insertion, Splice site
- **Inframe Mutations:** Inframe deletion, Inframe insertion
- **Fusion Mutations**
- **Other Mutations:** All other types of mutations

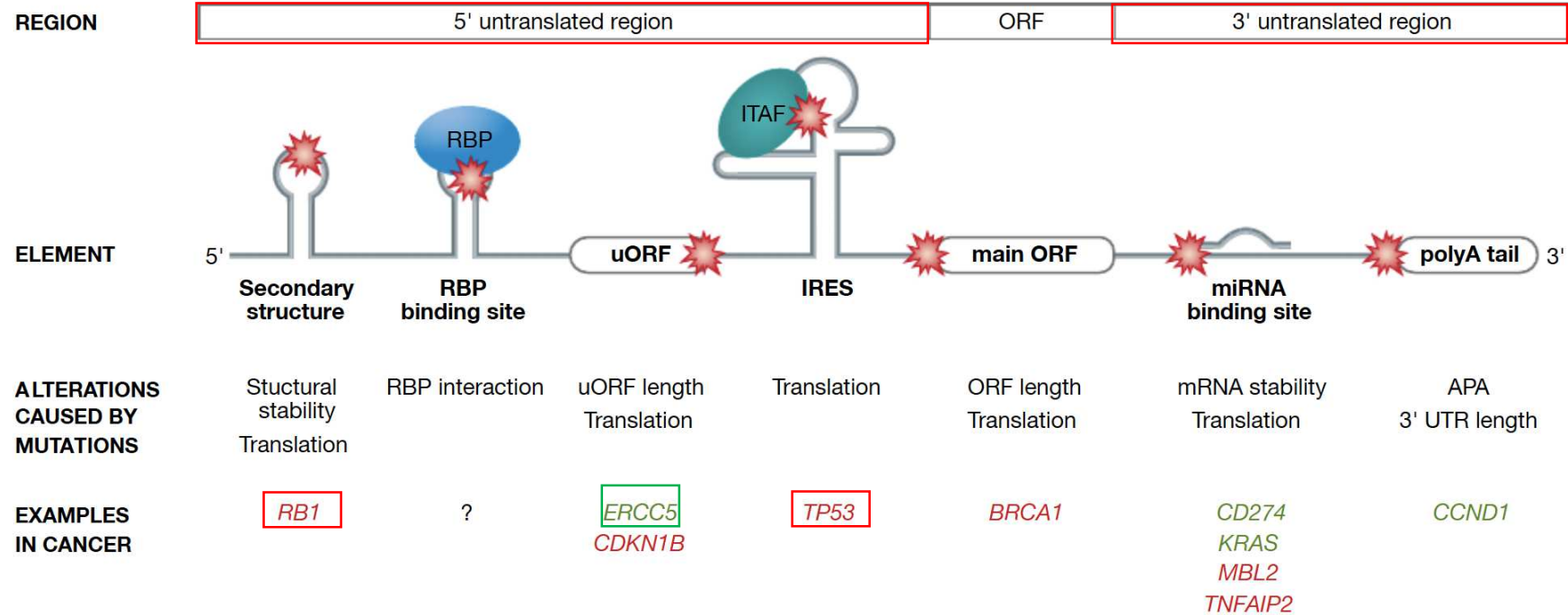
Adapted from <https://www.cbioportal.org/results>

FOXA1: DNA binding protein



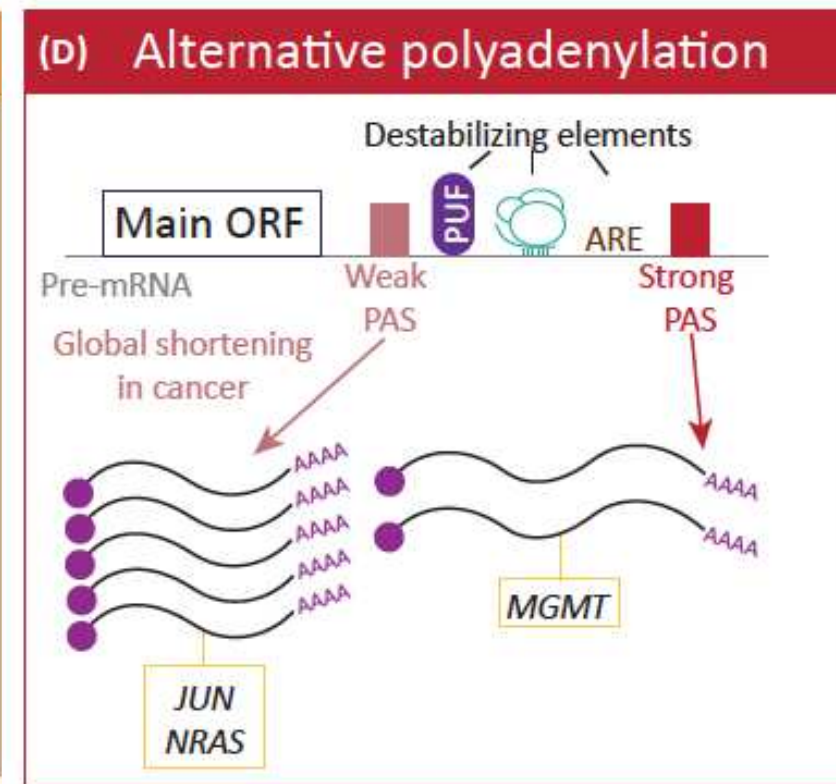
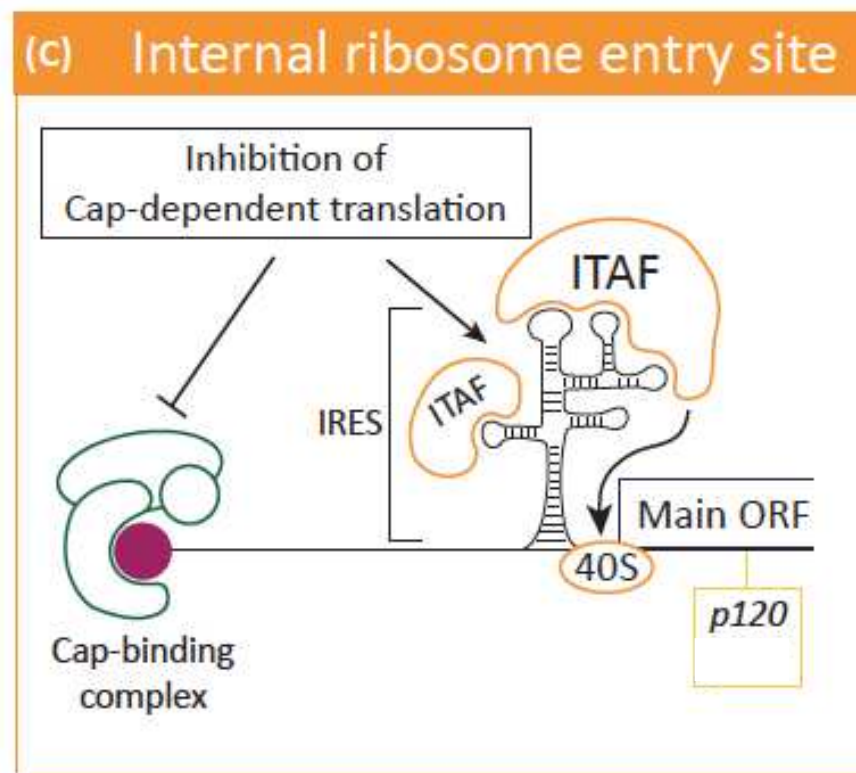
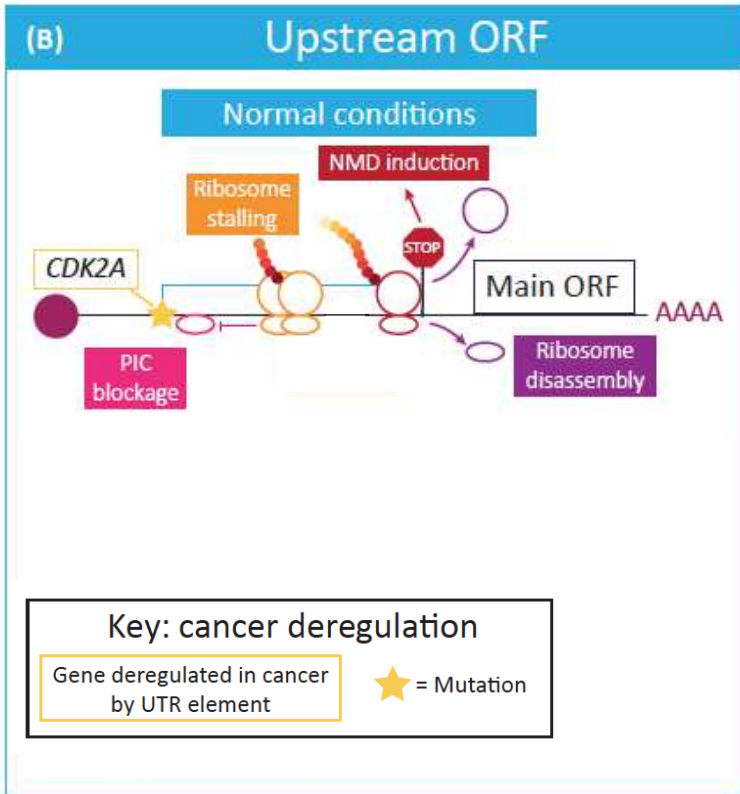
Adapted from Annala M et al, Communications Biology, 2018

Regolazione genica in 5' e 3' UTR

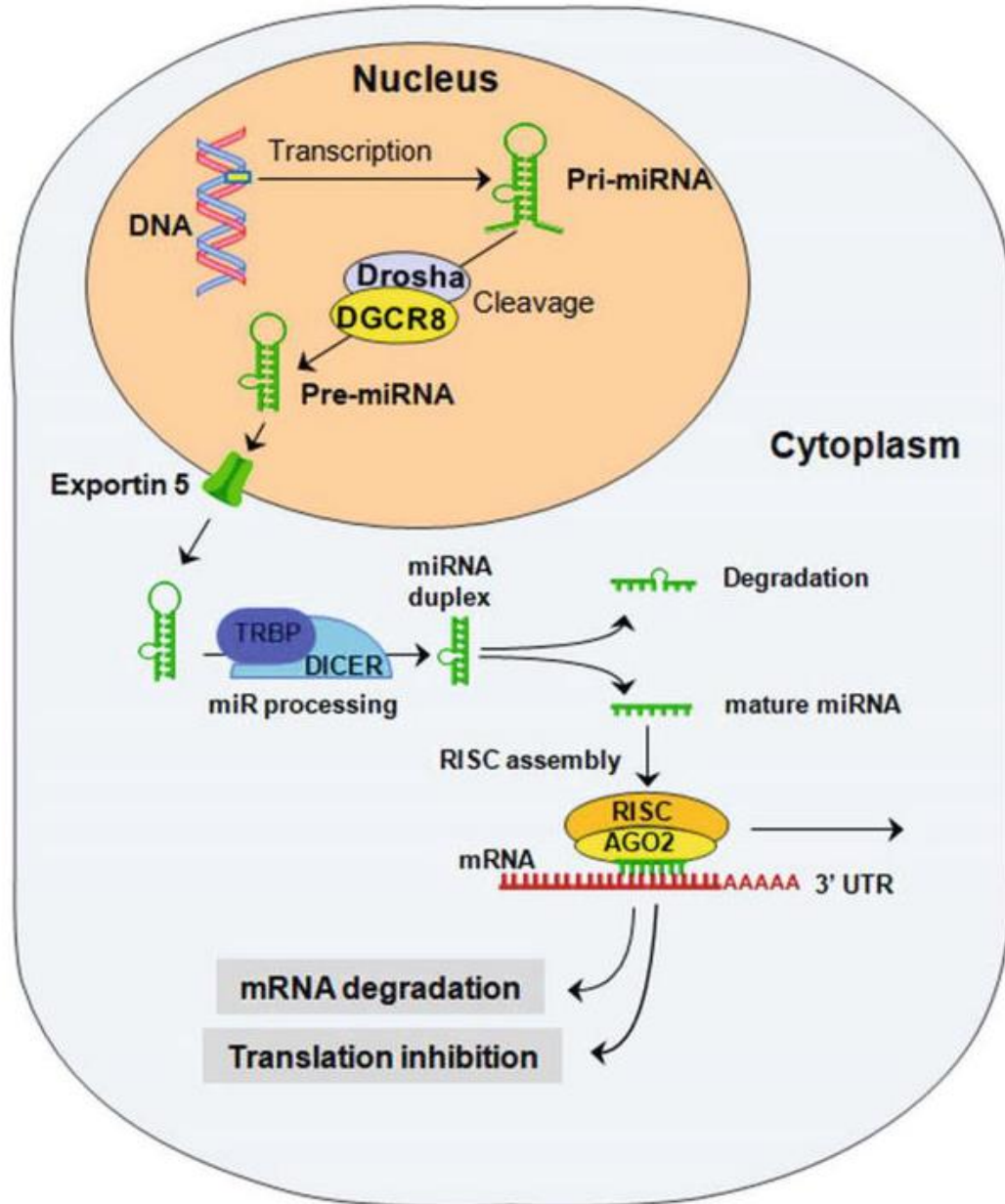


Gene	Variant	Regulatory element/Mechanism	Effect on protein	Cancer type	Reference
<i>CDKN1B</i>	4-bp deletion C.-456-453del (g)	uORF	Decrease	MEN4	Occhi <i>et al</i> (2013)
<i>CDKN2A</i>	G-34T (g)	Aberrant initiation codon	N/A	Melanoma	Liu <i>et al</i> (1999)
<i>C-MYC</i>	C2756T (s)	IRES	Increase	Multiple myeloma	Chappell <i>et al</i> (2000)
<i>ERCC5</i>	A25G (SNP)	uORF	Increase	Pediatric ependymoma	Somers <i>et al</i> (2015)
<i>RAD51</i>	G135C (SNP)	Splice site/secondary structure	Decrease	Breast cancer	Antoniou <i>et al</i> (2007)
<i>RB1</i>	G17C, G18U (SNV, N/A)	Secondary structure	Decrease	Retinoblastoma	Kutchko <i>et al</i> (2015)
<i>TP53</i>	C119T (SNP)	IRES	Decrease	Melanoma	Khan <i>et al</i> (2013); Soto <i>et al</i> (2005)

uORF, IRES, APA e il loro contributo nel cancro



Biogenesi dei miRNA




NUCLEO

-RNA polimerasi II  → 

-DROSHA } cleavage complex 
 -DGCR8 }

-5-RAN-GTP 

CITOPLASMA

-TRBP } miR processing 
 -DICER }


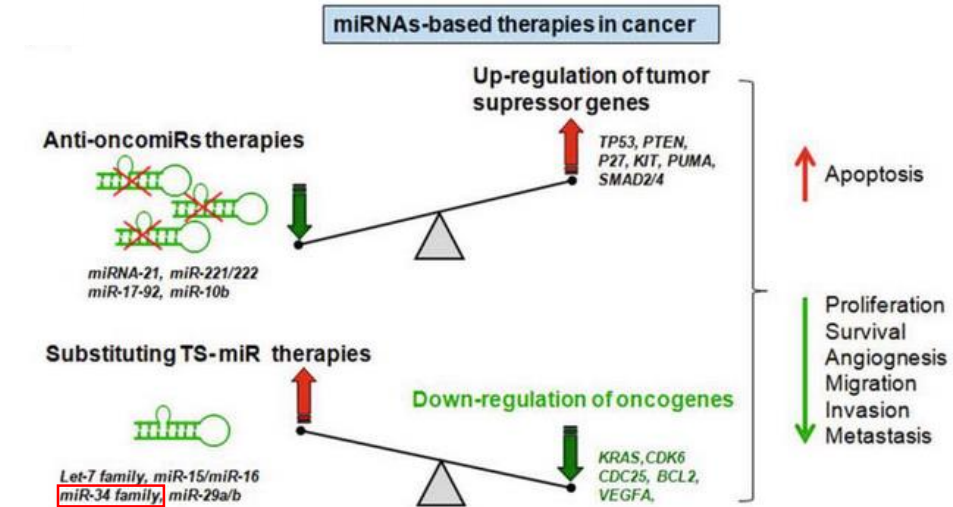
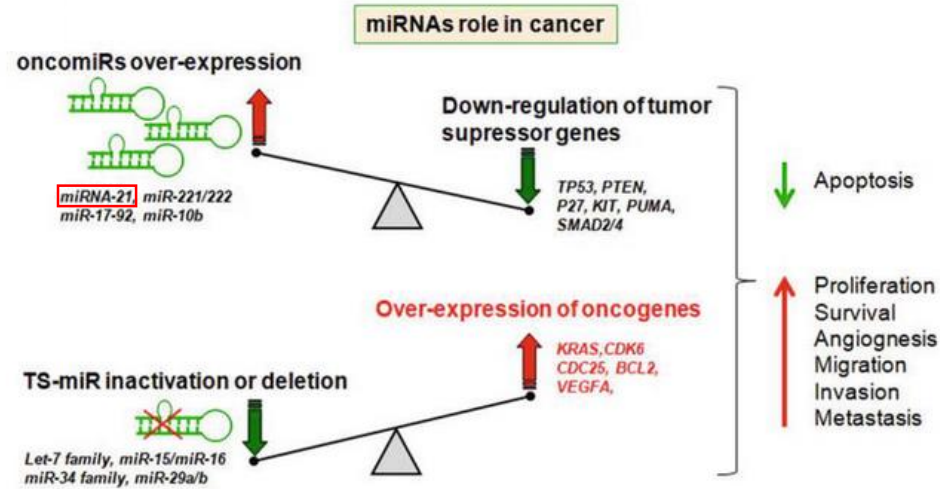
-RISC } 
 -AGO }

Diagram description: A schematic showing a mature miRNA (5' to 3') binding to the 3' UTR of an mRNA transcript (3' to 5'). The miRNA sequence is shown as a series of vertical bars (seed region) that base-pair with the mRNA sequence.

Il doppio ruolo dei miRNA: oncogeni e potenziali terapeutici

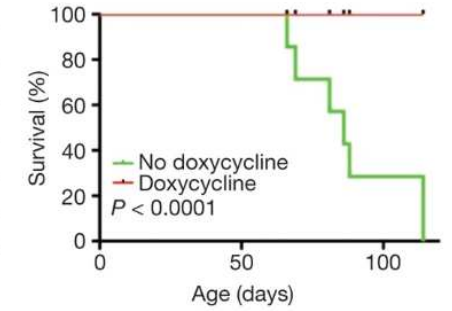
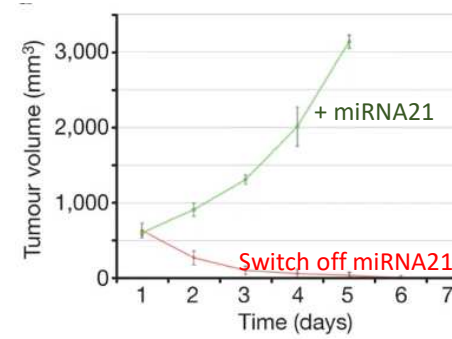


Balacescu O et al, IntechOpen, 2018

OVER-ESPRESIONE di miRNA-21
in un topo transgenico:
sviluppo grave adenopatia



RIDUZIONE DI ESPRESSIONE di miRNA-21:
regressione del tumore

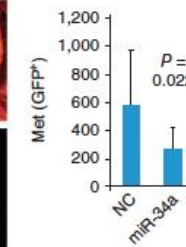
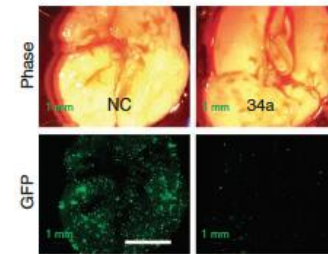


Post trattamento con doxiciclina per disattivare la OVER espressione di miR- 21: il tumore si riduce e la sopravvivenza è aumentata

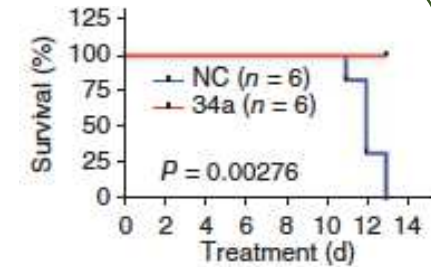
Medina P et al, Nature, 2010



Iniezione di cellule cancerogene(GFP+)
- controllo
+ miR-34a



Sviluppo delle metastasi al
polmone solo nei topi di
controllo



Sopravvivenza aumenta nei
topi in cui è espresso miRNA
34

Liu C. et al, Nature Medicine, 2010

miRNA in terapia

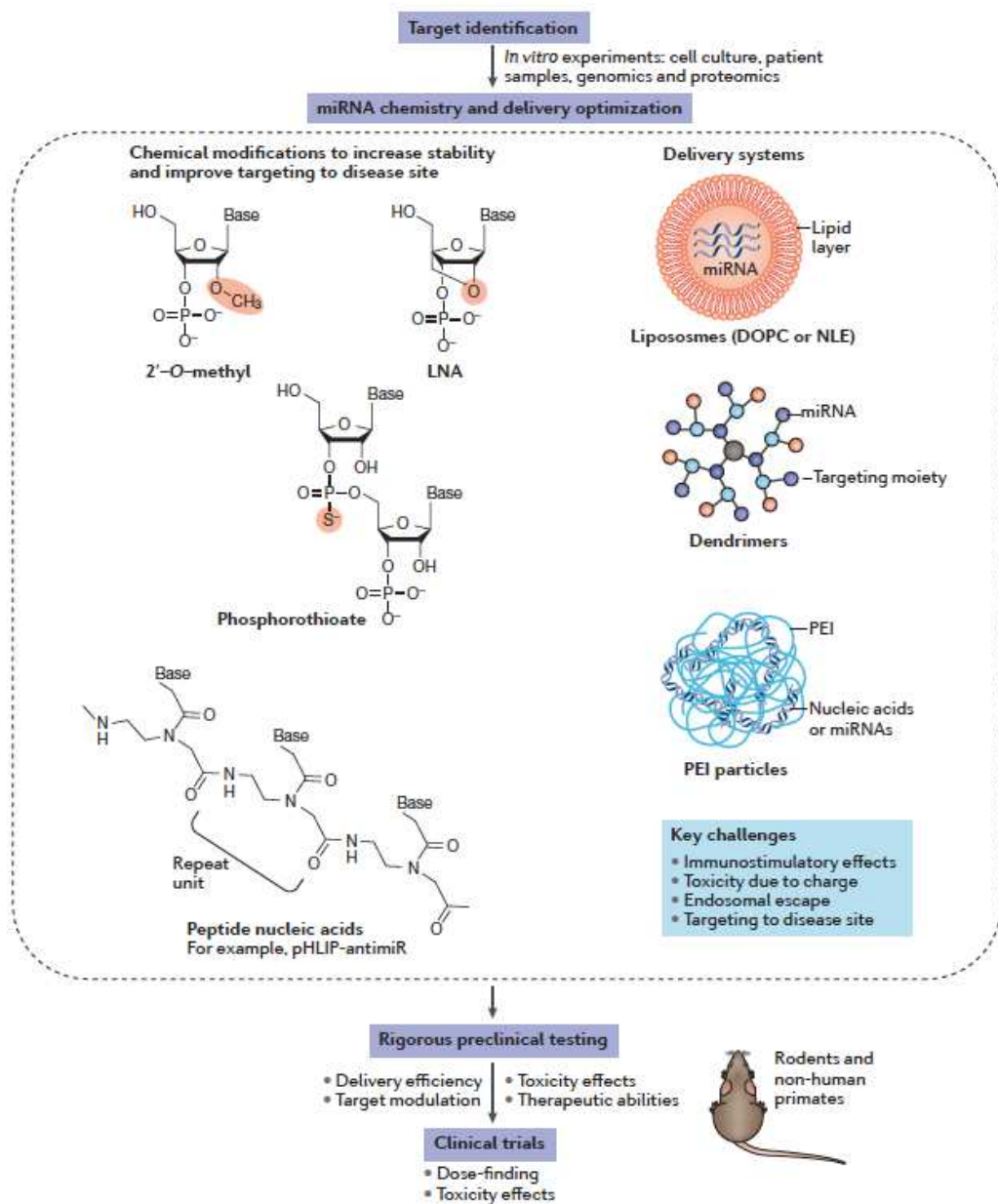


Table 1 | Selected miRNAs in cancer and other diseases and their therapeutic manipulation in preclinical models

miRNAs	Diseases	Important mRNA targets	Preclinical models	In vivo delivery systems
miRNAs with tumour suppressive function (miRNA mimics as therapeutics)				
let-7 family	• Solid tumours (e.g. breast, colon, ovarian, lung, liver and glioma) • B cell lymphoma	MYC, BCLXL, pan-RA5, EZH2, HMGA2, FAS, P21, PGRMC1 and DICER1	• Lung cancer (orthotopic) ¹⁰⁷ • <i>Kras</i> ^{G12D} GEM ¹⁰⁸	Neutral lipid emulsions
miR-34a	• Solid tumours (e.g. lung, liver, colon, brain, prostate, pancreatic, bladder and cervical) • Myeloma • B cell lymphoma	BCL2, MET, MYC, CDK6, CD44, SRC, E2F1, JAG1, FOXP1, PDGFRA, PDL1 and SIRT1	• Lung cancer (xenograft and orthotopic) ¹⁰⁷ • <i>Kras</i> ^{G12D} GEM ¹⁰⁸ • Pancreatic cancer (orthotopic) ¹⁰⁸ • Prostate cancer (orthotopic) ¹⁰⁷	• Lipid nanoparticles • Neutral lipid emulsions
• miR-143 • miR-145	• Solid tumours (e.g. bladder, lung, breast, colon, pancreas, cervical, and head and neck) • Lymphoid leukaemia	KRAS, ERK5, VEGF, NFKB1, MYC, MMPs, PLK1, CDH2 and EGFR	• Colon cancer (orthotopic) ¹⁰⁰ • Pancreatic cancer (orthotopic) ¹⁰¹	Liposomes, PEI
miR-200 family	Solid tumours (e.g. breast, ovarian and lung)	ZEB1, ZEB2, BMI1, SUZ12, JAG1, SOX2, SP1, CDH1 and KRAS	• Lung cancer (orthotopic) ^{101,111} • Ovarian cancer (orthotopic) ¹⁰¹ • Breast cancer (orthotopic) ¹⁰¹	• Liposomes • DOPC neutral lipid system
OncomiRs (antimiRs as therapeutic agents)				
miR-10b	Solid tumours (e.g. breast and glioma)	NF1, CDH1, E2F1, PIK3CA, ZEB1 and HOXD10	• Glioblastoma (orthotopic) ¹¹⁸ • Breast cancer (orthotopic) ¹⁰¹	Locked nucleic acid antimiRs
miR-155	• Solid tumours (e.g. liver, lung, kidney, glioma and pancreas) • B cell lymphoma • Lymphoid leukaemia	SHIP, SPI1, HDAC4, RHOA, SOCS1, BCL2, JMID1A, SOX6, SMAD2, SMAD5 and TP53INP1	Lymphoma miR-155 overexpressing GEM ^{118, 119}	pHLIP-conjugated antimiR
• miR-221 • miR-222	Solid tumours (e.g. liver, pancreas and lung)	CDKN1B, CDKN1C, BMF, RB1, WEE1, APAF1, ANXA1 and CTCF	Liver cancer (HCC xenograft) ¹¹⁸	Cholesterol-conjugated antimiR
Other				
miR-122	HCV infection and related liver diseases	HCV 5' site, CAT1, CD320, ALDOA and PPARB	HCV mouse model ^{124,128}	Phosphorothioate DNA-locked nucleic acid antimiR
miR-33	Atherosclerosis	SREBF2, ABCA1, CROT, CPT1A, HADHB and PRKAA1	HFD mouse ^{143,144}	• 2'-F or MOE phosphorothioate DNA antimiR • Locked nucleic acid antimiR
miR-208	• Cardiac disease • Cardiac stress • Myocardial infarction	MED13, SOX6 and MYH7B	Dahl hypertensive rat ¹³⁸	Locked nucleic acid antimiR
miR-21	• Kidney fibrosis • Cardiac fibrosis	PTEN, PDCD4, SMAD7, SPRY and PPAR	• Pressure overload model of heart disease ¹³⁰ • Kidney injury mouse model ¹³¹	Locked nucleic acid antimiR
miR-192	Diabetes-related kidney complications	Type I collagens, ZEB1 and ZEB2	Streptozotocin-induced type 1 diabetes mouse ¹⁹²	Locked nucleic acid miRNA mimic
miR-29c	Diabetes-related kidney complications	HDAC4 and MMPs	<i>db/db</i> mouse ¹⁹³	Naked antagomiRs
• miR-103 • miR-107	Diabetes	CAV1	• <i>ob/ob</i> mouse ¹³⁶ • HFD mouse	Locked nucleic acid antimiR
miR-15	Myocardial infarction	CHEK1	Ischaemia-reperfusion injury mouse ¹⁹⁴	Locked nucleic acid antimiR

Conclusioni

Le regioni 5' e 3' UTR:

- Sono coinvolte nei processi di regolazione dell'espressione genica post-trascrizionale
- Possono ospitare mutazioni responsabili dell'insorgenza di tumori
- Elementi regolatori che possono essere correlati ai fenotipi tumorali sono: uORF, RISC, ABA, miRNA binding site
- Mutazioni negli elementi regolatori implicano un ridotto funzionamento dei soppressori tumorali o un aberrante funzionamento degli oncogeni determinando l'insorgenza del cancro

i miRNA:

- Sono una classe di *small RNA* endogeni che agiscono da regolatori post-trascrizionali di mRNA target
- Possono avere un duplice ruolo nel cancro, agendo come potenziali oncogeni o oncosoppressori
- Le potenzialità dell'uso dei miRNAs in ambito terapeutico sono tutt'ora uno degli obiettivi della ricerca

Bibliografia

1. Samantha L. Schuster and Andrew C. Hsieh, (2019), *The Untranslated Regions of mRNAs in Cancer*, Trends in Cancer
2. Matti Annala et al. (2018), *Frequent mutation of the FOXA1 untranslated region in prostate cancer*, Communications Biology
3. Sven Diederichs et al. (2016), *The dark matter of the cancer genome: aberrations in regulatory elements, untranslated regions, splice sites, non-coding RNA and synonymous mutations*, EMBO Mol Med
4. Ovidiu Balacescu et al. (2018), *MiRNA-Based Therapeutics in Oncology, Realities, and Challenges*, IntechOpen
5. Pedro P. Medina et al. (2018) *OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma*, IntechOpen
6. Can Liu et al. (2011), *The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44*, Nature Medicine
7. Rajesha Rupaimoole and Frank J. Slack, (2017), *MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases*, Nature Rev Drug Discovery

Sitografia

1. <https://www.sciencemag.org/news/2019/10/sugar-coated-rnas-could-alter-face-biochemistry-we-know-it-if-they-re-real>
2. <https://www.1010genome.com/whole-genome-sequencing>
3. https://en.wikipedia.org/wiki/File:Gene_structure_eukaryote_2_annotated.svg
4. https://www.cbioportal.org/results/mutations?cancer_study_list=prad_fhcr%2Cprostate_dkfz_2018%2Cprad_broad_2013%2Cprad_broad%2Cprad_cpcg_2017&Z_SCORE_THRESHOLD=2.0&RPPA_SCORE_THRESHOLD=2.0&data_priority=0&profileFilter=0&case_set_id=all&gene_list=TP53&geneset_list=%20&tab_index=tab_visualize&Action=Submit

Riassunto esteso

L'RNA messaggero prodotto in seguito al processo di trascrizione è costituito da tre regioni distinte: quella codificante che verrà poi tradotta in una specifica proteina, la **regione ORF** (open reading frame) e le due **regioni UTR**, "Untranslated regions" all'estremità 5' e 3'. Mentre la regione ORF è responsabile della produzione di una proteina di lunghezza e composizione aminoacidica nota, le due porzioni di RNA che non vengono tradotte, rivestono un ruolo particolarmente importante a livello della regolazione genica post-trascrizionale e nel mantenimento dell'omeostasi cellulare. Recenti studi di grandi consorzi come TCGA ad ICGC basati sul sequenziamento dell'intero genoma umano hanno riportato l'esistenza di numerose mutazioni specifiche nei tumori non solo a carico delle sequenze codificanti per le proteine ma anche delle sequenze non codificanti. Tali aberrazioni che possono avvenire al di fuori della regione codificante, includono mutazioni a livello degli "enhancers", dei "silencers", degli "insulators" del promotore così come della regione 5' UTR e 3' UTR. Le mutazioni possono alterare la struttura secondaria del 5' o 3' UTR o verificarsi in siti di legame della proteina legante l'RNA (RBP), ORF a monte (uORF), siti di ingresso dei ribosomi interni (IRES), avviare codoni di open reading frame (ORF), siti di legame di micro RNA o siti di adenilazione multipla (polyA). Queste alterazioni possono influenzare l'efficienza della traduzione, la stabilità dell'mRNA, la lunghezza dell'ORF o l'interazione RBP, nonché causare scissione e poliadenilazione alternative (APA). Particolare attenzione va rivolta ai miRNA, un gruppo di small RNA che agiscono a livello post trascrizionale controllando tramite silenziamento i geni ad essi relativi. Nel contesto del cancro, essi possono avere un duplice ruolo. Infatti possono agire sia da potenziali oncogeni che da oncosoppressori. Come si sa il cancro è una malattia genetica causata principalmente dall'attivazione di un oncogene o dall'inibizione di un gene che agisce da soppressore del tumore. In questo contesto è importante sottolineare che l'espressione di alcuni oncogeni come TERT o miR-21 così come geni oncosoppressori quali TP53, APC, BRCA1 o RB1 possono essere influenzati da questi meccanismi aberranti che coinvolgono le sequenze non codificanti. Dal momento che recenti studi hanno riportato l'aumento del numero di mutazioni negli elementi regolatori dell'UTR o ne hanno identificato un'errata espressione, molte questioni rimangono ancora aperte riguardo il loro meccanismo d'azione e quale impatto abbiano nelle patologie umane. Le nuove frontiere di ricerca in questo campo sono tutt'ora dirette a :

- scoprire il reale ruolo che tali alterazioni rivestono nel processo di tumorigenesi;
- trovare nuove tecnologie per individuare e studiare gli UTR cancerogeni;
- individuare potenziali opportunità terapeutiche che hanno come obiettivo le regioni non codificanti.