



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea
Scienze Biologiche

Ruolo degli RNA non codificanti nel cancro
The role of non-coding RNAs in cancer

Tesi di Laurea di:
MATTEO CONTI

Docente Referente:
ANNA LA TEANA

Sessione Luglio 2024
Anno Accademico 2023/2024

Sommario

La tesi esplora il ruolo critico degli RNA non codificanti (ncRNA) nel contesto del cancro

La presentazione è articolata in 5 punti principali :

1. Introduzione agli ncRNA

1. Presentazione generale degli ncRNA, con un'analisi delle diverse categorie, tra cui microRNA (miRNA), long non-coding RNA (lncRNA) e RNA circolari (circRNA).
2. Discussione dei meccanismi mediante i quali gli ncRNA agiscono ed influenzano l'espressione genica

2. Focus su miR15 e miR16 nella CLL

1. Analisi della regione deleta in CLL comprendente i due microRNA (miR15 –miR16) che giocano un ruolo cruciale nella patogenesi della CLL.
2. Studio delle anomalie nell'espressione di miR15 e miR16 nei pazienti con CLL
3. Esplorazione della loro attività soppressiva nei confronti di oncogeni e la loro influenza nella regolazione dell'apoptosi

3. Regolazione dei Geni Soppressori Tumorali (TSG)

1. Investigazione dell'associazione tra i microRNA e i geni soppressori tumorali (TSG)

4. Ruolo dei Micropeptidi nel Cancro

1. Esplorazione del ruolo emergente dei micropeptidi nella biologia del cancro.
2. Studio del micropeptide miPEP133, identificato come un importante soppressore tumorale.

5. Terapie a ncRNA: Sfide e possibili

1. Panoramica delle sfide sull'utilizzo di terapie basate sugli RNA non codificanti con le relative soluzioni possibili

RNA non codificanti (ncRNA)

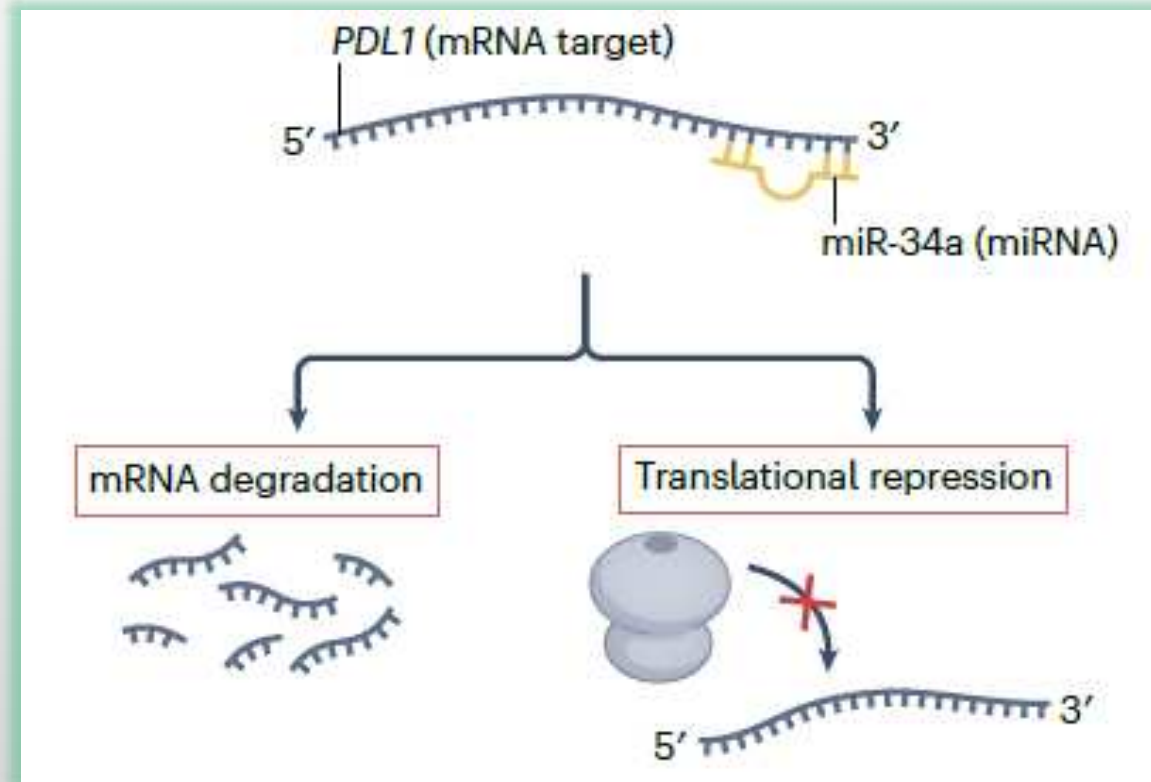
- **microRNA (miRNA)**: regolano la traduzione di gran parte dei trascritti umani
- **lunghi RNA non codificanti (lncRNA)**: regolazione espressione genica tramite reclutamento dei complessi rimodellatori della cromatina, azione «spugna» per i miRNA (es. HOTAIR)
- **RNA circolari (circRNA)**: si legano agli mRNA, possono formare complessi circRNA-proteine, «spugne» per i miRNA

disregolazione correlata a diverse malattie umane tra cui:

- cancro
- malattie cardiovascolari
- malattie infettive
- disturbi neurologici

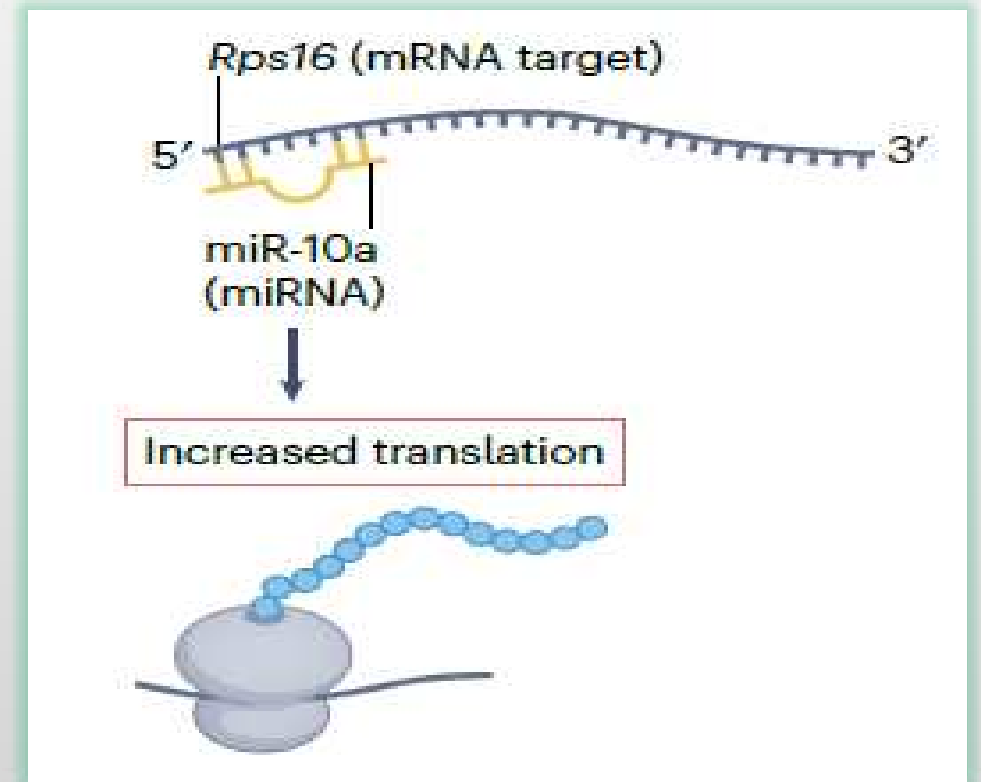
Azione dei miRNA

Targeting 3'UTR



- *Regola la risposta immunitaria contro il cancro*

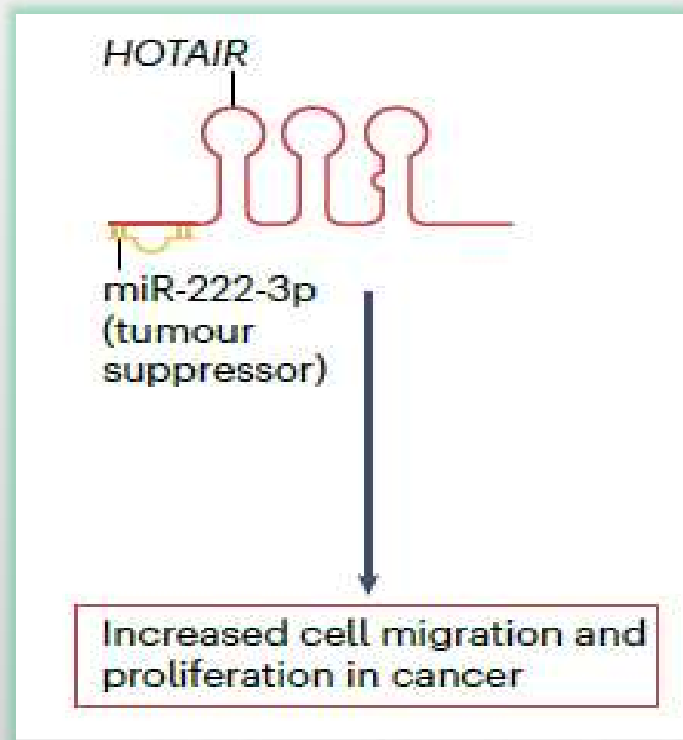
Targeting 5'UTR



- *Incrementa la traduzione di Rps16*

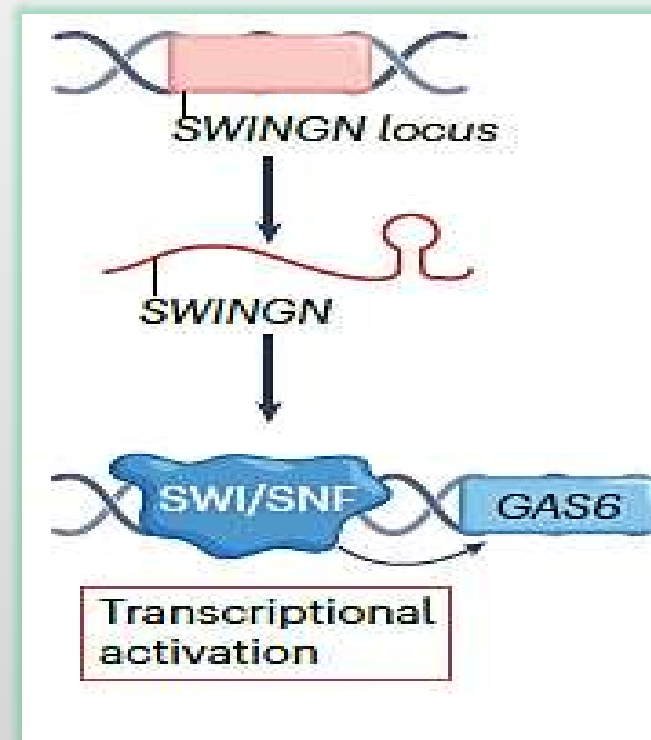
Lunghi RNA non codificanti

HOTAIR agisce come spugna di miR-222-3p



- *contribuisce alla progressione del cancro ovarico*

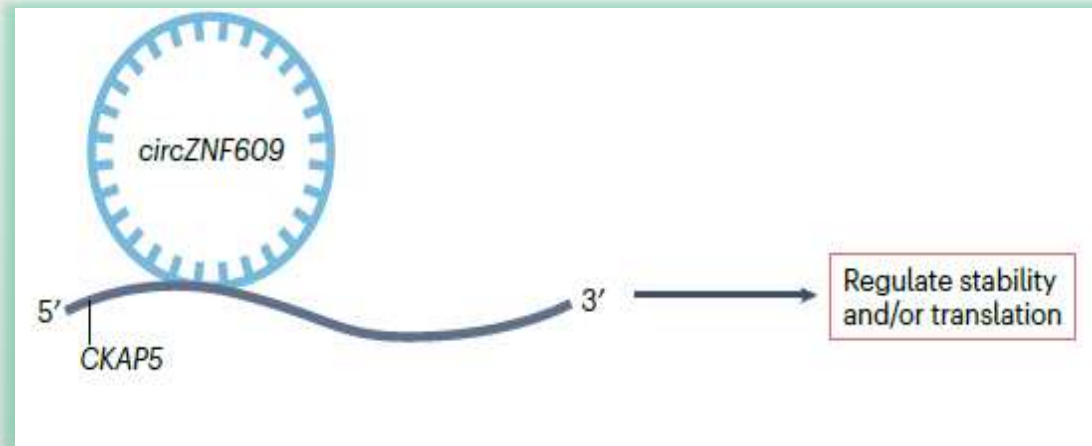
SWINGN modula l'attivazione dell'oncogene GAS6



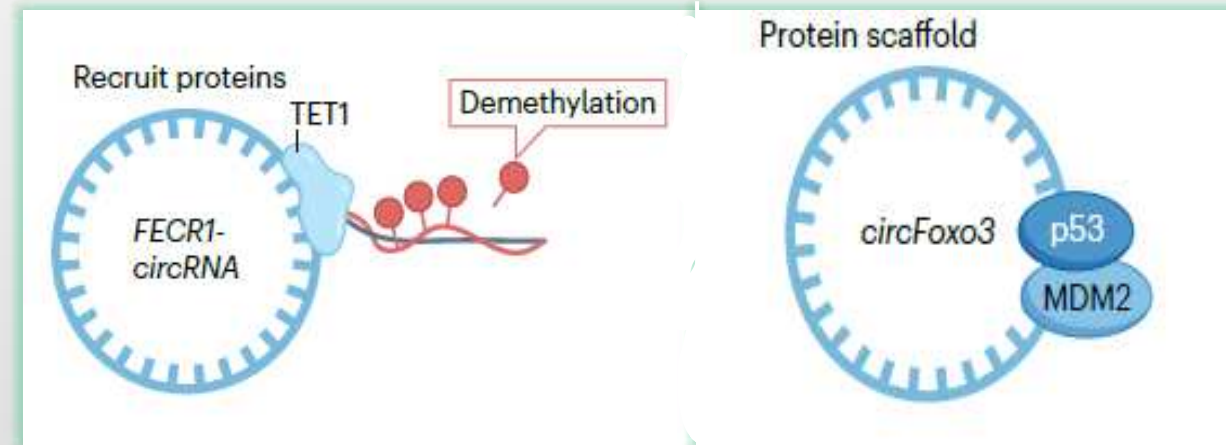
- *Promozione proliferazione cellulare*
- *Inibizione dell'apoptosi*

Azione dei circRNA

Interazione con mRNA



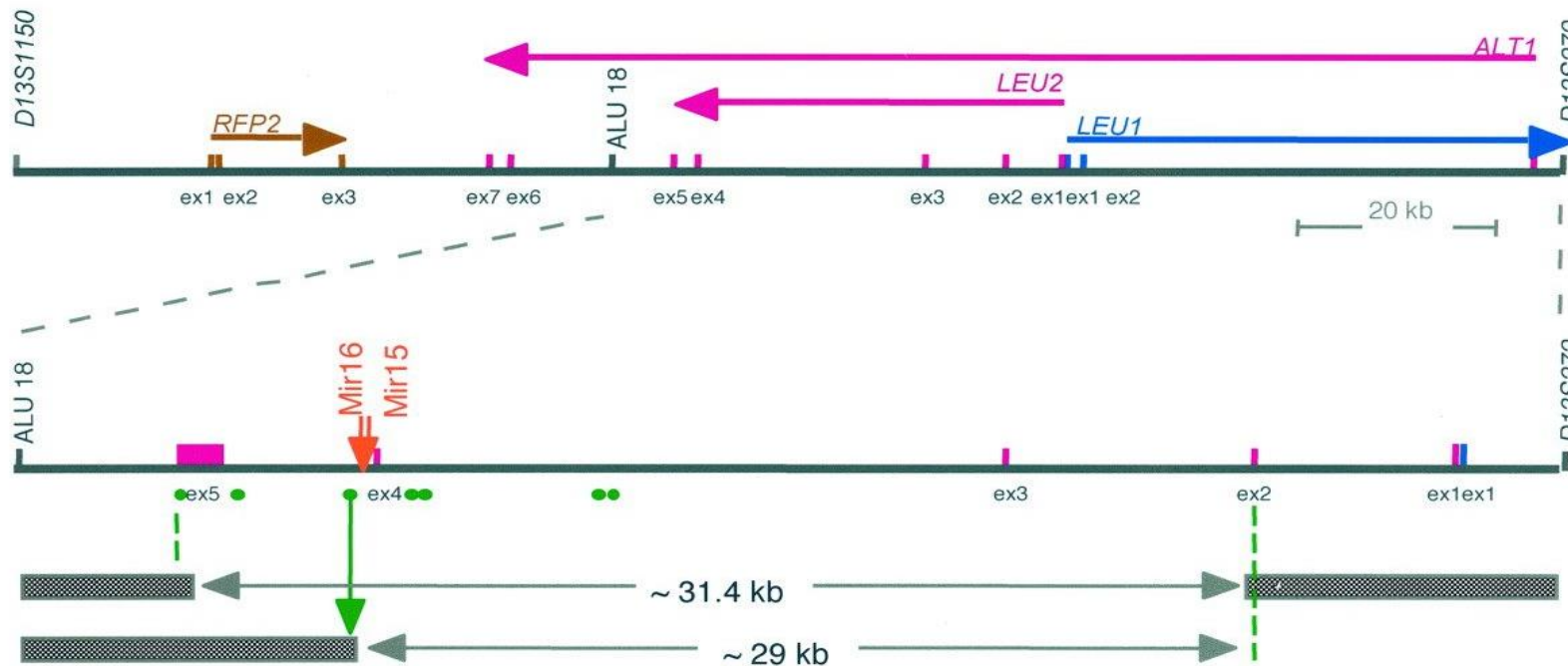
Interazione con proteine



- Favoriscono l'attivazione trascrizionale
- Consentono la co-localizzazione di enzima e substrato facilitando la cinetica della reazione

Delezioni e down-regolazione dei geni miR15 e miR16 nella leucemia linfatica cronica (CLL):

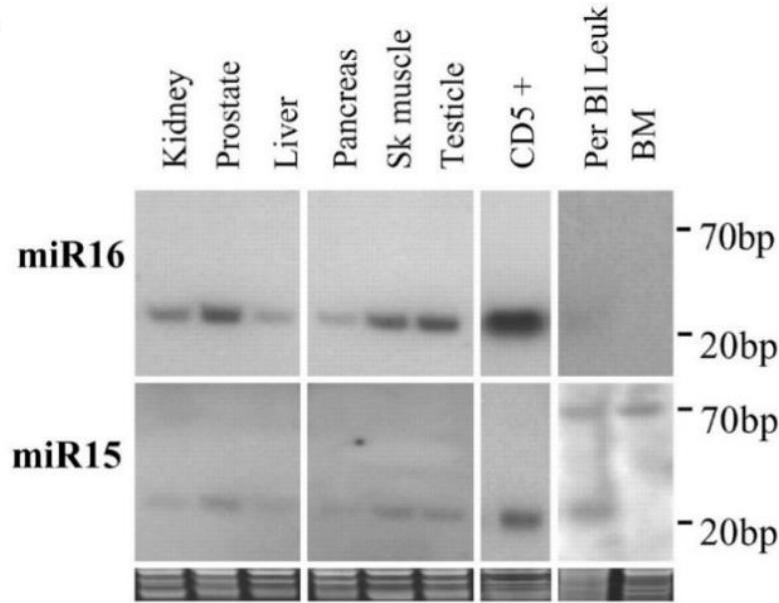
- proliferazione anomala e incontrollata dei linfociti B che danneggia vari organi e tessuti.
- In oltre il 50% dei casi di CLL si verifica la delezione della regione cromosomica 13q14, contenente geni per miR15 e miR16.
- gene soppressore tumorale all'interno di una regione di delezione di 29 kb tra gli esoni 2 e 5 del gene LEU2



- Mappa del locus di interesse tra i marcatori ALU 18 e D13S272
- Cluster miR15-16 nella regione di delezione
- LEU escluso come possibile gene soppressore tumorale

miR15 e miR16 sono altamente espressi nelle cellule CD5+

a



significativa riduzione dell'espressione di miR15 e miR16 nella maggior parte dei pazienti affetti da CLL e in 5 delle 6 linee cellulari tumorali analizzate

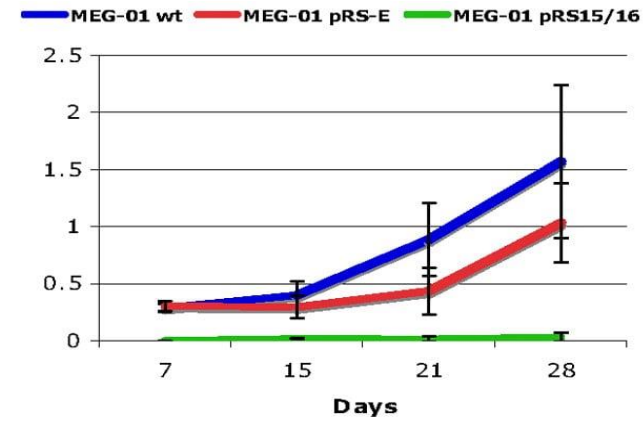
68% dei campioni CLL presenta perdita di eterozigosi (LOH)



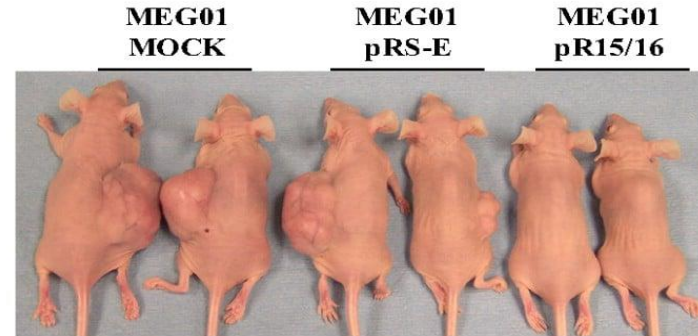
In tutti: riduzione espressione di miR15-16

Effetto di miR15-miR16 nelle cellule MEG01

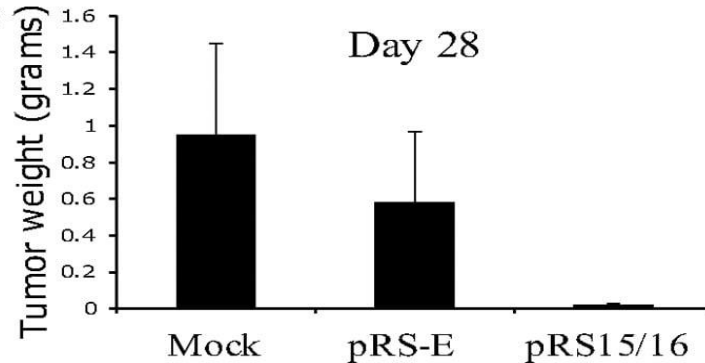
A



B



C



➤ Cellule leucemiche MEG01 trasfettate con miR15/16 inoculate nei topi

➤ Crescita tumorale completamente inibita in 3/5 topi

➤ Identificata firma di 60 geni in comune tra B-CLL e MEG0 pR15/16 regolata da miR15 e miR16

➤ Possibili target: MCL1; c-JUN

Associazione tra microRNA e geni soppressori tumorali TSG

Associazione funzionale tra i microRNA e i geni TSG in grado di influenzare la progressione del cancro

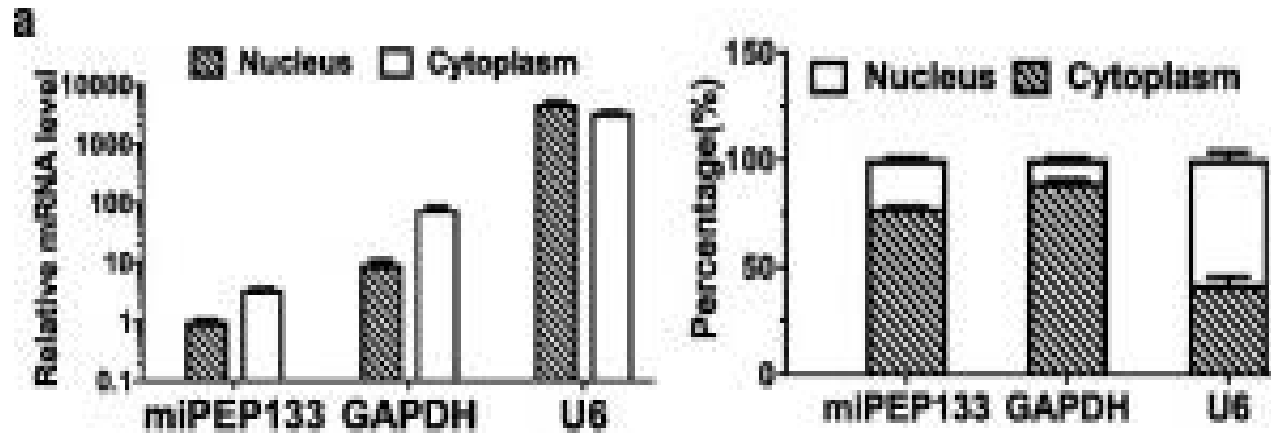
L'analisi statistica ha mostrato un forte arricchimento di TSG tra i bersagli repressi dai miRNA associati alle firme del cancro

Valutazioni sulla frequenza dei vari meccanismi di regolazione nei TSG hanno messo in evidenza che in alcuni tumori la regolazione tramite miRNA può essere esclusiva:

- PTEN
 - FAT4
 - CDK12
- 
- REGOLATI DAI SOLI miRNA

Micropeptidi (miPEP) nel cancro

- Nonostante la loro originaria classificazione come non codificanti, alcuni ncRNA contengono sORFs che codificano piccoli peptidi regolatori (sPEP), o micropeptidi codificati da miRNA (miPEP)
- miPEP133 è un micropeptide codificato dal trascritto primario di miR-34a. È altamente espresso nella faringe normale e significativamente down-regolato nel carcinoma nasofaringeo (NPC)



- *miPEP133* altamente espresso in diversi tessuti umani (colon, ovaio, stomaco, utero) e nella linea NP69
- L' mRNA corrispondente si localizza principalmente a livello citoplasmatico.
- Interagisce direttamente con HSPA9



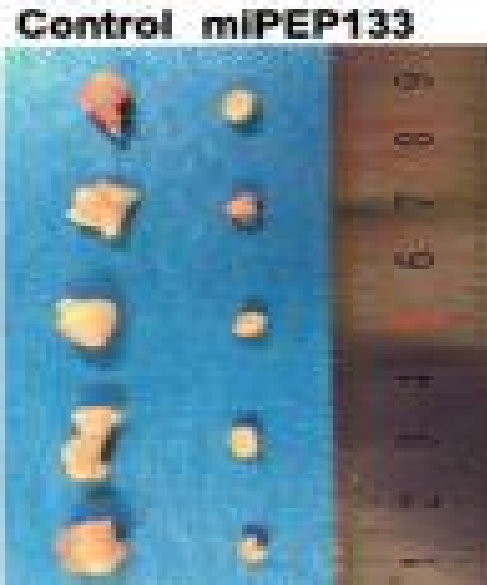
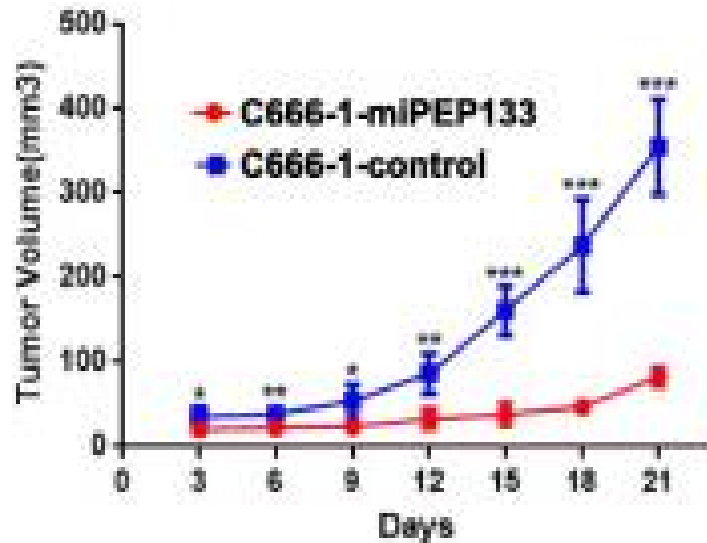
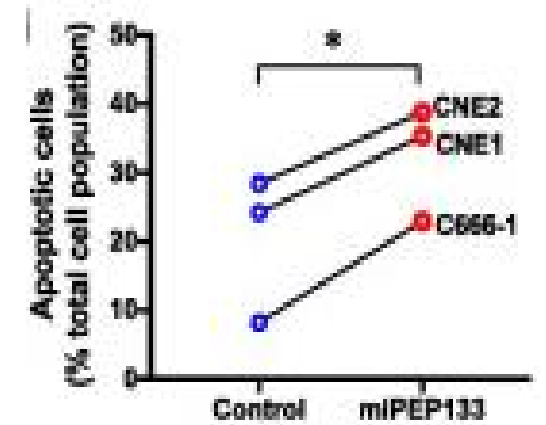
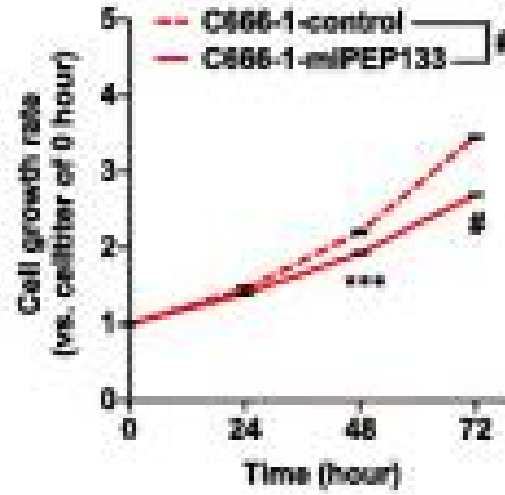
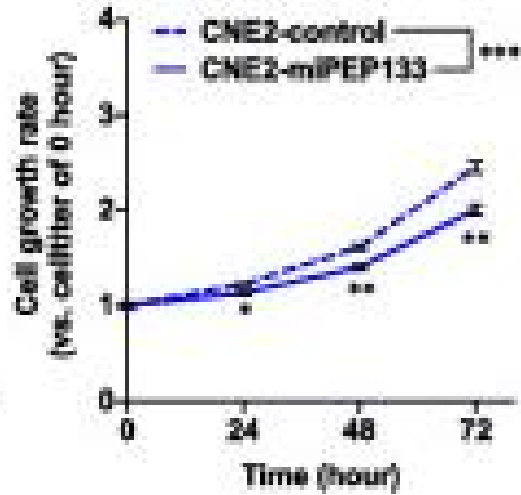
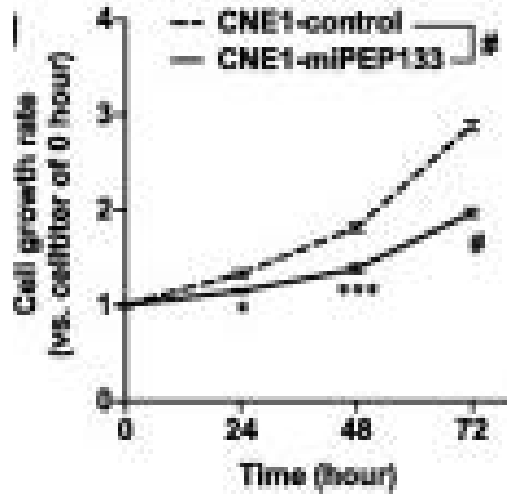
6 linee cellulari tumorali mostrano livelli significativamente più bassi di miPEP133 rispetto alle cellule non tumorali NP69.



Ipotesi di soppressore tumorale

miPEP133 inibisce la proliferazione, la migrazione e l'invasione delle cellule tumorali

micropeptide sovraespresso nelle linee cellulari: CNE1; CNE2; C666-1



Cellule C666-1 sovraesprimenti miPEP133 iniettate sottocute nel fianco di topi.

crescita tumorale significativamente soppressa rispetto a cellule di controllo C666-1

Kang, M. et al. Identification of miPEP133 as a novel tumor-suppressor microprotein encoded by miR-34a pri-miRNA. *Mol. Cancer* 19, 143 (2020).

Approcci terapeutici a ncRNA: sfide e possibili soluzioni

Ostacolo	Possibile soluzione
Specificità ed effetti fuori bersaglio	<p>Modulazione miRNA cellula-specifici: limita notevolmente la sovraespressione dannosa di miRNA nelle cellule non desiderate (es anti-miR155 nel neuroblastoma)</p> <p>Utilizzo trascritti circolari: più stabili, effetti RNAi più efficienti e prolungati</p>
Consegna	<p>Nanoparticelle lipidiche (LNP): aumentano biocompatibilità, riducono tossicità cellulare e assorbimento non specifico (es. miRNA MIMIC MRX34)</p> <p>Polimeri sintetici: alternative valide per somministrazione di miRNA</p>
Immunogenicità	<p>Espansione dello screening delle reazioni avverse immuno-correlate con metodi di interazione TLR: migliore previsione delle risposte immunitarie avverse, selezione di candidati terapeutici più sicuri e riduzione del rischio di reazioni avverse</p>

BIBLIOGRAFIA :

- Calin, G. A. et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99, 15524–15529 (2002).
- Calin, G. A. et al. miR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 5166–5171 (2008).
- Dhawan, A., Scott, J. G., Harris, A. L. & Buffa, F. M. Pan-cancer characterisation of microRNA across cancer hallmarks reveals microRNA-mediated downregulation of tumour suppressors. *Nat. Commun.* 9, 5228 (2018).
- Kang, M. et al. Identification of miPEP133 as a novel tumor-suppressor microprotein encoded by miR-34a pri-miRNA. *Mol. Cancer* 19, 143 (2020).
- Winkle, M., El-Daly, S. M., Fabbri, M. & Calin, G. A. Noncoding RNA therapeutics — challenges and potential solutions. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 20, 629–651 (2021).