

miRNAs: profilo di espressione nella patologia preneoplastica della cervice uterina e loro possibile ruolo nella carcinogenesi. Dati preliminari

A. Lukic, S. Pizzuti*, C. De Vitis**, E. Giarnieri **, N. Zanesi ***, F. Nobili*, M. Di Properzio*, MR. Giovagnoli**, C. M. Croce***, R. Mancini***

**Dipartimento di Scienze Ginecologiche, Perinatologia e Puericultura, UOC Ginecologia
 Direttore Prof. Massimo Moscarini, Azienda Ospedaliera Sant'Andrea, Sapienza Università di Roma
 **Laboratorio di Citopatologia -- Azienda Ospedaliera Sant'Andrea, Sapienza Università di Roma
 *** Laboratory of Microbiology and Immunology, Columbus Ohio, USA*

La Colposcopia in Italia Anno XXII – N. 4 pagg. 05-07

I microRNAs (miRNAs) sono piccoli RNA non codificanti, lunghi 19-25 nucleotidi, che agiscono da silenziatori genici attraverso un meccanismo definito RNA interference, scoperto nel 1998 dagli americani Andrew Fire e Craig C. Mello.

Tale processo è attivo in funghi, piante, animali e cellule umane suggerendo una sua origine molto antica (1).

I primi risultati si ebbero nel 1993 da Lee che scoprì il primo MicroRNA: Lin-4 che regola lo sviluppo di *Caenorhabditis Elegans*, un verme nematode.

Nel 2000, sempre in *C. Elegans*, il gruppo di Reinhart ha scoperto il gene Lethal-7 (Let-7), gene con funzione analoga a quella di Lin-4 ma con un bersaglio tuttora sconosciuto, che presenta omologhi anche nell'uomo (2, 3).

Questa scoperta ha di fatto iniziato la caccia ai MicroRNA, rivelando che anche gli RNA possono giocare un ruolo nella regolazione della sintesi proteica (4).

Nel 2006 Fire e Mello hanno vinto il premio Nobel per la medicina e fisiologia per i loro lavori nel campo della RNA interference (RNAi) (5, 6).

RNAi è un processo specifico secondo il quale l'RNAi machinery, una volta individuato una molecola di RNA a doppio filamento (RNAds) (che può esser prodotto da un nuovo transgene, un virus o da un nuovo elemento genetico) è in grado di portare alla degradazione tutti gli mRNA complementari presenti nel citosol, con conseguente calo di sintesi della proteina da essi codificata (7).

Il termine più corretto per indicare in generale l'insieme degli RNA non codificanti di piccole dimensioni è smallRNA (RNA piccoli).

Tale famiglia si divide in quattro sottofamiglie: siRNA (Short Interfering RNAs), miRNA (MicroRNAs), TncRNAs (Tiny Non Coding RNA) e SmRNA (Small Regulatory RNA).

Molti studi hanno dimostrato che i miRNAs sono coinvolti in diversi processi: lo sviluppo e la differenziazione, la proliferazione cellulare, l'apoptosi, lo sviluppo neuronale, ma sicuramente il più importante è l'oncogenesi.

Tuttavia, indipendente dal riconoscimento delle funzioni molecolari e/o biologiche associate ai diversi miRNA, è plausibile che deviazioni dai loro caratteristici profili di espressione in cellule normali possano essere causa di patologie.

Alla base vi è un meccanismo di deregolazione dell'espressione genica.

Recentemente sono stati studiati un gruppo di geni codificanti per piccoli RNAs chiamati microRNAs il cui profilo di espressione è stato trovato alterato in molti tumori, potendo essere aumentato o diminuito rispetto ai rispettivi tessuti sani. Questo suggerisce che i miRNAs possano comportarsi come oncogeni o oncosoppressori, a seconda del gene che targhettano (8, 9, 10). Essi vengono rispettivamente chiamati OncoMir e Tumor Suppressor Mir.

Si evince l'importanza del loro uso come possibili marker diagnostici, fattori prognostici e nuovi target a livello terapeutico (9, 11, 12).

Dall'insieme degli studi condotti fino ad oggi sul carcinoma della cervice, è emerso un profilo d'espressione

caratteristico dei microRNAs, dal quale risultano diminuiti miR143, miR126, miR23, miR145, mentre risultano aumentati miR15, miR16, miR21, miR146a, miR155, miR199a (13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21).

Inoltre, riguardo il profilo di espressione genico del carcinoma della cervice, si è trovata un'amplificazione del cromosoma 5p ed i geni up-regolati in questa zona sono rappresentati dal complesso RNAsIII Drosha responsabile del processamento dei miRNAs (22).

Presso l'Ambulatorio di Colposcopia e Patologia del basso tratto genitale femminile dell'U.O.C. di Ginecologia della II Facoltà di Medicina e Chirurgia, Sapienza, Università di Roma, Azienda Ospedaliera Sant'Andrea, a partire dal giugno 2007, sono state selezionate 124 pazienti.

Il campione preso in esame è stato suddiviso in diversi gruppi partendo dai risultati del Pap test.

Gli esami citologici delle pazienti sono stati repertati secondo il Bethesda System 2001.

È stato inoltre effettuato il prelievo esoendocervicale per la ricerca di microRNA, assegnando ad ogni provetta un numero di riferimento.

Presso il nostro laboratorio, è stata effettuata l'estrazione dei miRNA secondo il protocollo Trizol. Una volta isolato l'RNA, i primi 50 campioni, dopo essere stati suddivisi in sei classi in base alla diagnosi citologica delle pazienti esaminate, sono stati spediti in USA presso il Laboratorio di Microbiologia e Immunologia, Università Columbus in Ohio (OH) e qui studiati con la tecnica dei Microarray.

Successivamente, è stata spedita anche la rimanente parte dei campioni, ma fino ad ora, i risultati in nostro possesso sono in relazione solo ai primi 50 campioni.

Il nostro studio è stato il primo a porsi come obiettivo quello di identificare il profilo di espressione dei miRNAs nelle lesioni preneoplastiche della cervice. In particolare, ci siamo proposti di:

1. Identificare il profilo di espressione dei miRNA sui nostri campioni con diagnosi citologica negativa, ASC, LSIL infezione da HPV, LSIL (con displasia), ed HSIL.
2. Identificare i profili di espressione dei micro RNAs nelle lesioni di basso grado (LSIL con displasia) e alto grado (HSIL), confrontandoli con i profili di espressione relativi al gruppo con diagnosi citologica negativa, LSIL infezione da HPV ed ASC.
3. Confrontare il profilo di espressione dei miRNAs individuati nelle lesioni benigne (LSIL infezione da HPV ed ASC) con quelli emersi nel gruppo di lesioni basso e alto grado (LSIL con displasia e HSIL).

I risultati sono stati analizzati statisticamente tramite il

test t di Student e la loro attendibilità è stata valutata secondo il p-value, prendendo come riferimento un valore accettabile se inferiore a 0,05 ($p < 0,05$).

Dalla analisi multivariata dei nostri risultati preliminari sono emersi 6 tipi di miRNAs - target nelle lesioni preneoplastiche della cervice: miRNA 124-1, miRNA 125A, miRNA 105-1, miRNA 140, miRNA 551-b e miRNA 610.

In dettaglio, concentrandoci sui "geni-target" da noi osservati, si è visto che vi è comunque stata una differenza significativa nella frequenza d'espressione dei miRNAs a favore del gruppo LSIL-HSIL rispetto a quella degli altri gruppi considerati (negativi, LSIL infezione da HPV, ASC).

Ciò conferma che questi miRNAs potrebbero essere dei markers di progressione, relativi alle pazienti con diagnosi citologica di LSIL ed HSIL, rispetto ai casi di basso grado, caratterizzati da infezione virale senza displasia.

Per cercare di capire come i miRNAs possano essere correlati al processo di cancerogenesi, il primo step è stato quello di analizzare il loro locus nei cromosomi umani (23), in quanto sappiamo che diverse alterazioni genetiche ed epigenetiche sono state riscontrate nel processo di cancerogenesi della cervice uterina.

Paragonando i nostri risultati riguardo la ricerca del locus cromosomico dei miRNAs con i dati della letteratura a nostra disposizione sul processo di cancerogenesi della cervice (24), è emerso che il miR-551b, localizzato sul cromosoma 3q, ed il miR-610, localizzato sul cromosoma 11p, potrebbero essere implicati nella fase di immortalizzazione delle CIN2/3, rivelandosi dei markers delle lesioni preneoplastiche, a livello degli step più tardivi.

Inoltre, si può anche supporre che altre alterazioni geniche che coinvolgano diversi cromosomi, rispetto a quelli sopracitati, intervengano nelle prime fasi della cancerogenesi, e più precisamente nel passaggio dall'infezione alla displasia.

Dato che i miRNAs da noi riscontrati sono stati trovati overespressi nei casi LSIL HSIL, rispetto ai casi di infezione, si può supporre che gli altri quattro geni target (miR 140, miR124-1, miR105-1e miR125A) che mappano su diversi cromosomi, potrebbero essere coinvolti in questa fase del processo oncologico.

Anch'essi, quindi, sono candidati come possibili markers delle lesioni preneoplastiche ma, a differenza dei miR 551b e miR610, quest'ultimi quattro sarebbero legati al livello iniziale della cancerogenesi.

I microRNAs, potrebbero, quindi, rappresentare dei markers di progressione delle lesioni preneoplastiche, fornendo una valutazione "dinamica" con significato prognostico della patologia HPV correlata.

Bibliografia

1. Novina Carl D., Sharp Philipp A. "The RNAi Revolution" 2004 Nature Publishing Group.
2. Melino G., Ciliberto G., "Argomenti di Biologia Molecolare, vita, morte e miracoli" Società Editrice Universo.
3. Negrini Massimo, Ferracin Manuela, Sabbioni Silvia, Croce Carlo M. "MicroRNAs in human cancer: from research to therapy" 2007 Journal of Cell Science.
4. Zhang Wenyong, Dahlberg James E., Wayne Tam "MicroRNAs in Tumorigenesis" 2007 American Journal of Pathology.
5. http://it.wikipedia.org/wiki/Rna_interference.
6. Blenkiron Cherie, Miska Erik A. "MiRNAs in cancer: approaches, aetiology, diagnostics and therapy" 2007 Human Molecular Genetics.
7. Novina Carl D., Sharp Philipp A. "The RNAi Revolution" 2004 Nature Publishing Group.
8. Melino Gennaro, Ciliberto Gennaro "Argomenti di Biologia Molecolare, vita, morte e miracoli" Società Editrice Universo.
9. Blenkiron Cherie, Miska Erik A. "MiRNAs in cancer: approaches, aetiology, diagnostics and therapy" 2007 Human Molecular Genetics.
10. Negrini Massimo, Ferracin Manuela, Sabbioni Silvia, Croce Carlo M "MicroRNAs in human cancer: from research to therapy" 2007 Journal of Cell Science.
11. Cowland Jack B., Hother Christoffer "MicroRNAs and Cancer" 2007 Journal Compilation.
12. Cho Williams CS "OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers" 2007 Molecular Cancer.
13. Weng-Onn Lui, Nader Pourmand, Bruce K. Patterson, Fire Anderw "Patterns of Known and Novel Small RNAs in Human Cervical Cancer" 2007 Cancer Research.
14. Pfeffer S., Sewer A, Lagos-Quintana M. et al "Identification Herpes Virus Family" 2005 Nature Method of microRNAs.
15. Cai X, Li Gi, Laiminis La, Cullen BR "Human Papillomavirus genotype 31 does not express detectable microRNA levels during latent or productive virus replication" 2006 Journal of Virology.
16. Thorland EC, Myers ssl, Gostout BS, Sith DI "Common Fragile sites are preferential target for HPV 16 integrations in Cervical Tumors" 2003 Oncogene.
17. Martinez I., Gardiner A. S., Board K. F. et al "Human papillomavirus type 16 reduces the expressions of microRNA-218 in cervical carcinoma cells" 2007 Oncogene.
18. Jeong-Won Lee, Chel Hun Choi et al "Altered MicroRNA Expression in Cervical Carcinoma" 2008 Clin Cancer Res; 14 (9).
19. Xiaohong Wang, Shuang Tang et al "Aberrant Expression of Oncogenic and Tumor-Suppressive MicroRNAs in Cervical Cancer Is Required for Cancer Cell Growth" 2008 Plos One; 3 (7).
20. Yamato K., Yamada T., Kizaki M., Ui-Tei K, Natori Y, Fujino M., Nishihara T., Ikeda Y., Nasu Y, Saigo K, Yoshinouchi M. "New highly potent and specific E6 and E7 siRNAs for treatment of HPV16 positive cervical Cancer" 2008 Cancer Gene Research.
21. Takuma Fujtii, Miyuki Saitoi, Eri Iwasaki, Takairo Ochiya, Yoshifumi Takei, Shigenori Hayashi, akiko Ono, Nobumaru Hirao, Masaru Nakamura, Kaneyuki Kubushiro, Daisuke Aoki "Intratumor injection of small interfering RNA -targeting human Papillomavirus 18 E6 and E7 successfully inhibits the growth of Cervical cancer" 2006 International Journal of Oncology.
22. Muralidhar B, Goldstein LD et al "Global microRNA profiles in cervical squamous cell carcinoma depend on Drosha expression levels" 2007 J Pathol; 212: 368-377.
23. <file://miRNA> Entry for MI0003575.htm miRBase: Sequences.
24. Snijders PJF et al "HPV - mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications" 2006 J Pathol; 208: 252-64.