

El paper dels micro-RNA en el desenvolupament tumoral

Escrit per

Pedro Medina

Universitat de Granada

Premi Josep M.
Sala-Trepal
2012

Els micro-RNA (miRNA) són molècules reguladores de l'expressió gènica en la traducció dels RNA missatgers (RNAm) a proteïna. Tenen un paper fonamental en l'establiment de la identitat cel·lular i ajuden a la determinació de la funcionalitat. Així, contribueixen a expressar determinats grups de gens en cada tipus de cèl·lula d'un organisme. Algunes disfuncionalitats en components de la maquinària de síntesi o en els miRNA *per se* han estat associades a diverses malalties humanes, com ara el càncer. Darrerament, s'ha trobat que els miRNA tenen un paper important en molts processos cel·lulars alterats en el càncer, com ara la diferenciació, la proliferació i l'apoptosi. Som només al principi d'entendre les repercussions funcionals del guany o de la pèrdua d'un micro-RNA particular; tot i això, el camp aporta prometedores aplicacions mèdiques en el diagnòstic, pronòstic i tractament del càncer.

Els micro-RNA (miRNA) són una classe de molècules de RNA petites que regulen l'expressió gènica després de la transcripció. Es van trobar per primera vegada en el cuc *Caenorhabditis elegans*, i aleshores van ser considerades una peculiaritat dels nematodes, fins que es va observar que algunes d'aquestes molècules eren conservades filogenèticament en una àmplia varietat d'organismes, incloent-hi els humans. Ara, s'ha trobat la importància que tenen com a reguladors de l'expressió gènica. I també que permeten de mantenir la seva identitat a les cèl·lules; ja que, quan no hi ha els nivells normals, sovint es perd la diferenciació cel·lular, un procés comú en el desenvolupament tumoral. Per tant, com es podria esperar, les alteracions en la via dels miRNA afecten molts processos cel·lulars que normalment s'alteren en el càncer, com ara la proliferació, la diferenciació, l'apoptosi, el procés de metastasi i el manteniment dels telòmers.

Els miRNA: genòmica, biogènesi i mecanisme d'acció

Els miRNA són una llarga família de RNA que no codifiquen proteïnes i mesuren entre 19 i 25 nucleòtids. El 2011, la base de dades de miRNA tenia 17.341 entrades, descoberts en 142 organismes (*mirbase.org* v16). Al voltant de mil d'aquestes entrades han estat documentades en humans, però els models computacionals en prediuen més.

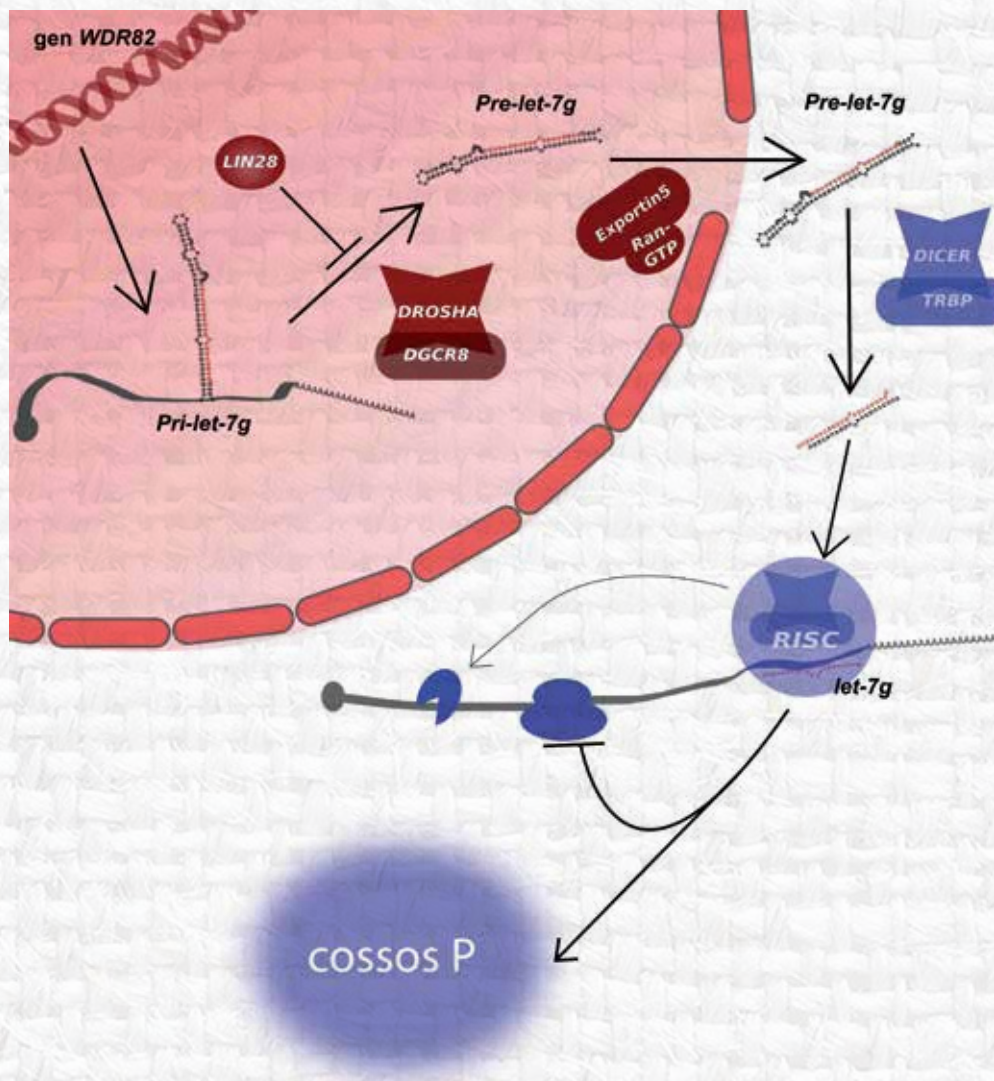
Aproximadament, la meitat dels gens que codifiquen miRNA estan organitzats en grups policistronics, és a dir, que codifiquen més d'una molècula alhora; però són processats per constituir-ne d'individuals. La resta és transcrita individualment. Més de dues tercers parts dels miRNA comparteixen unitats de transcripció amb gens codificadors de proteïna o RNA llargs no codificadors. Aquests darrers es poden transcriure sota el control dels seus propis

promotors, de promotors de gens propers o de promotors dels seus gens hostes. Gran part dels miRNA que sorgeixen de gens codificadors de proteïnes es troba en introns, mentre que els que sorgeixen de RNA codificadors més llargs es poden trobar en introns o en exons. D'altra banda, almenys un terç de les famílies de miRNA està molt conservat entre espècies, i el 60 % dels *loci* de miRNA està conservat de ratolins a humans.

L'esquema bàsic de la biogènesi dels miRNA es va descobrir recentment (figura 1). La major part es transcriu a partir de la RNA-polimerasa II com a transcrits primaris (pri-miRNA) que contenen una estructura 5' CAP i una cua 3' poliadenilada. Aquests pri-miRNA, que poden ser de diversos milers de nucleòtids, són processats per l'enzim RNAasa III, anomenat *Drosha*, i per la proteïna d'unió a RNA de doble cadena DGCR8, i es generen un o més precursors (pre-miRNA, figura 2).

Els pre-micro-RNA són formats per 65-85 nucleòtids i presenten una forta complementarietat interna que els fa plegar-se i establir estructures en forquilla, que s'assimilen a les que tenen els RNA de doble cadena. Els pre-miRNA són exportats al citoplasma mitjançant el factor d'exportació nuclear exportina-5 i el seu cofactor RAN-GTP. Un cop al citoplasma, els pre-miRNA són processats per un altre enzim RNAasa III (anomenat *Dicer*) i generen RNA de doble cadena d'uns 22 nucleòtids. Recluten la proteïna *Argonata 2* (hAgo2) i es completa així el complex silenciador induït per RNA (RISC). Només una de les dues cadenes (cadena guia) quedarà en el complex RISC. El factor que sembla determinar quin d'aquestes cadenes roman en el complex RISC és l'estabilitat de l'anellament que s'ha format.

L'expressió de l'RNA missatger es pot reprimir de dues formes, segons com es complementin el miRNA i la seva diana. Si el miRNA



◀ **Figura 1.** Esquema de la biogènesi dels miRNA. Els gens dels miRNA són transcrits per l'RNA-polimerasa II, que afegeix la modificació 5' (CAP) i la cua poli-A a la regió 3'. Aquest transcrit conté un RNA primari anomenat *pri-miRNA*, que és reconegut i tallat pel complex format per l'RNAasa III anomenada *Drosha* i per la proteïna d'unió a RNA DGCR8 resultant en un RNA plegat en forquilla, per la seva alta autocomplementarietat de bases de 84 nucleòtids, anomenat *pre-miRNA*. L'exportina-5 i el RAN-GTP transporten el pre-miRNA al citoplasma, on una altra RNAasa III, *Dicer*, en associació amb la proteïna d'unió a RNA TRBP, el processa per formar un RNA de doble cadena amb dos nucleòtids protuberants que és reclutat pel complex silenciador induït per RNA (RISC). A continuació, una de les cadenes, la cadena passatgera, s'elimina del complex i és degradada, i l'RNA madur guia el RISC cap als RNAm diana per inhibir-ne la traducció. La inhibició de la traducció dels RNAm pot fer, mitjançant la inhibició de la traducció proteica, la degradació del missatger o el segrest d'aquest en unes regions citoplasmàtiques especialitzades anomenades *cossos P*. A més, encara que no s'ha inclòs en aquesta figura, la biogènesi dels miRNA està regulada a diversos nivells.

.....
▲ Figura 2. Predicció termodinàmica del plegament bidimensional del precursor humà pre-miRNA. Els pre-miRNA mostren una estructura en forquilla deguda a una extensa complementarietat interna. Els diferents colors indiquen la força d'enllaç (vermell-fort, blau-feble). El miRNA caracteritzat és el miR-21, que es troba sobreexpressat en la major part dels tumors analitzats fins ara incloent-hi neuroblastoma, glioblastoma, càncer de pulmó, de mama i de pàncrees, leucèmies i limfoma. Diversos estudis funcionals han mostrat que el miR-21 té un paper oncogènic i està implicat en vies importants en càncer que inclouen: apoptosi, proliferació, migració, invasió i metastasi, i pot reprimir l'activitat de gens supressors tumorals, com ara PTEN, TPM1 i PDCD4.



s'uneix amb una complementarietat perfecta o gairebé perfecta a l'RNAm, és fragmentat pel complex RISC i degradat. Aquest mecanisme es dona principalment en plantes, tot i que també s'ha trobat en animals. Si la unió del miRNA al seu RNAm és imperfecta, s'inhibeix la traducció proteica i el missatger es degrada de manera variable. Aquest darrer escenari és el més comú en animals i la interacció es dona més freqüentment en les regions sense traduir 3' (UTR). S'han suggerit diversos mecanismes d'inhibi-

ció de la traducció, que inclouen: el bloqueig de l'inici de la traducció, el bloqueig de l'elongació o el segrest dels RNAm en els cossos P (*P-bodies*), compartiments especialitzats del citoplasma on es dona la repressió transcripcional i la degradació dels RNAm. Encara que no s'ha indicat a la **figura 1**, la maduració posttranscripcional dels miRNA està regulada com a resposta a un estímul de proliferació i diferenciació cel·lulars.

Les funcions dels miRNA com a reguladors: les seves dianes

No tots els gens codificadors de proteïnes estan regulats pels miRNA. Alguns gens que exerceixen funcions bàsiques del metabolisme cel·lular presenten una regió 3' UTR curta sense gairebé regions d'unió als miRNA. No obstant això, s'ha estimat que al voltant d'un 30 % de tots els gens codificadors de proteïnes presenten regulada la seva expressió mitjançant miRNA. Per tant, és concebible que els miRNA regulin una bona part de les rutes biològiques cel·lulars.

La predicció dels missatgers diana que són regulats pels miRNA és difícil pel fet que la major part de les vegades la unió amb la diana es realitza de manera parcialment complementària. Com a complexitat afegida, hi ha gens que presenten 3' UTR alternatives, la qual cosa pot fer que estiguin regulats per grups de miRNA diferents. S'han desenvolupat diversos algorismes bioinformàtics per predir dianes, la major part dels quals es basa en la presència d'una seqüència anomenada *llavor* (**Figura 3**), de set nucleòtids situats entre les posicions 2 i 8 del miRNA madur. Un altre factor utilitzat en aquests algorismes és la conservació filogenètica d'aquests llocs d'unió als miRNA de les regions 3' UTR de les dianes i l'absència d'estructures secundàries estables. S'ha estimat que un simple miRNA pot regular 200 gens diferents, per la qual cosa serien intrínsecament pleotrópics. Així, una funció aberrant dels miRNA podria desencadenar un trencament del balanç homeostàtic cel·lular que podria contribuir a una malaltia sistèmica.

Els miRNA i el càncer

El càncer és una malaltia complexa on un grup de cèl·lules anormals perd identitat i creix sense control, essent capaç d'envair i de colonitzar altres teixits. Aquest comportament invasiu pot desembocar en una fallida orgànica fatal. Hi ha moltes evidències que la carcinogènesi és un procés seqüencial de múltiples passes, on les cèl·lules malignes acumulen alteracions genètiques i epigenètiques que condueixen a una

Gen	Posició genòmica	Seqüència madura
hsa-let-7a-1	09:95978060-95978139	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT
hsa-let-7a-2	11:121522440-121522511	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT
hsa-let-7a-3	22:44887293-44887366	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT
hsa-let-7b	22:44888230-44888312	TGAGGTAGTAGGTTGTGTGTT
hsa-let-7c	21:16834019-16834102	TGAGGTAGTAGGTTGTATGTT
hsa-let-7d	09:95980937-95981023	AGAGGTAGTAGGTTGCATAGT
hsa-let-7e	19:56887851-56887929	TGAGGTAGCAGGTTGTATAGT
hsa-let-7f-1	09:95978450-95978536	TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT
hsa-let-7f-2	0X:53600878-53600960	TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT
hsa-let-7g	03:52277334-52277417	TGAGGTAGTAGTTGTACAGT
hsa-let-7i	12:61283733-61283816	TGAGGTAGTAGTTGTGCTGT
hsa-mir-98	0X:53599909-53600027	TGAGGTAGTAAGTTGTATTGTT
family seed		*GAGGTAC*****

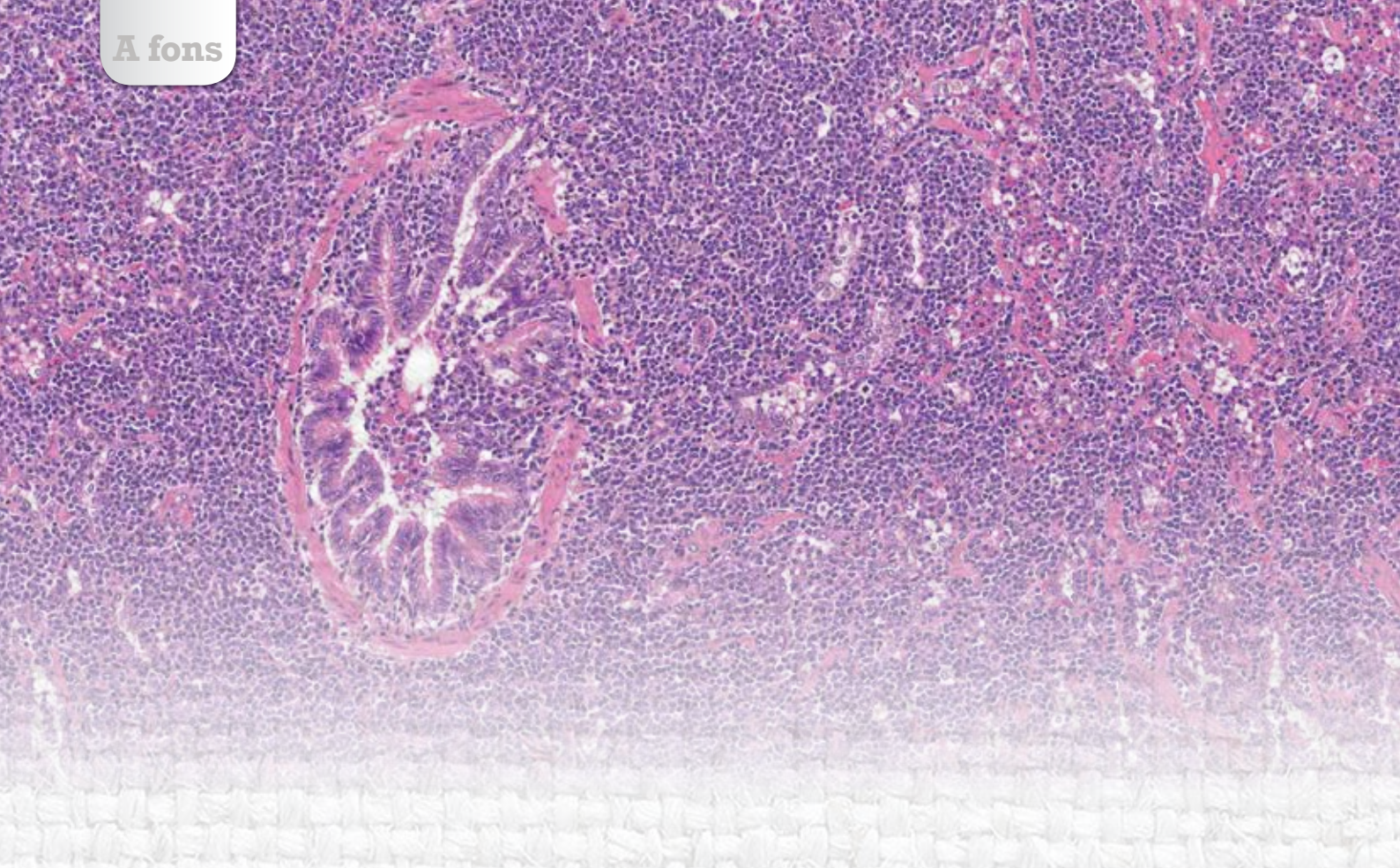
transformació progressiva en cèl·lules malignes. D'aquesta manera, les poblacions tumorals seleccionen alteracions en gens que promouen la progressió tumoral (oncogens) o que la dificulten (gens supressors tumorals). Al final del procés de transformació, les cèl·lules malignes perden la identitat cel·lular i adquireixen independència pel que fa al creixement, a la invasió i a la resistència a la senescència i a l'apoptosi.

Atès que els miRNA poden alterar l'expressió gènica, són candidats al manteniment del balanç en la proliferació cel·lular. Els estudis pioners van mostrar l'existència d'una expressió diferencial dels miRNA entre els teixits tumorals i els teixits normals. Tanmateix, això no vol dir que tots els miRNA pertorbats estiguin directament implicats en el desenvolupament tumoral; molts d'aquests miRNA podrien ser simplement espectadors indirectament alterats pels canvis genòmics i epigenòmics que sorgeixen durant la carcinogènesi, sense ser-ne els agents causants.

No solament s'han relacionat miRNA específics amb el càncer, sinó que també hi han estat relacionats alguns components de la maquinària de biogènesi. Recentment s'ha vist que mutacions de *Drosha*, de *DGCR8* o de *Dicer* (proteïnes bàsiques de la biogènesi) també col·laboren en la transformació tumoral. Aquestes troballes concorden amb resultats anteriors de la pèrdua d'expressió de *Dicer* en alguns tumors, i una pèrdua global d'expressió de miRNA en tumors, quan es comparen amb teixits normals. D'altra banda, en cèl·lules mare embrionàries de ratolí, la pèrdua condicional de *Dicer* o de *DGCR8* impedeix la diferenciació i proliferació cel·lulars, cosa que podria conduir a l'aparició de processos neoplàstics. Altres components de la maquinària de biosíntesi dels miRNA que s'han relacionat amb el càncer inclouen els membres de la família de proteïnes Argonauta (*hAgo1/EIF2C1*, *hAgo3/EIF2C3*, *hAgo4* i *HiWi*). Les proteïnes *hAgo1*, *hAgo3* i *hAgo4* s'agrupen en la regió cromosòmica 1p34-35, que sovint es perd

◀ **Figura 3.** El gen *Lethal-7* (*let-7*) va ser descobert inicialment com un gen fonamental en el desenvolupament del nematode *C. elegans* i és un dels primers miRNA descoberts. En humans, s'han trobat dotze membres de la família *let-7* que codifiquen nou miRNA madurs (ja que hi ha tres còpies de *let-7a* i dues de *let-7f*). Les seqüències de *let-7* madures s'han conservat molt bé al llarg de l'evolució, de manera que, per exemple, les *let-7a* d'humans, de ratolins i de cucs comparteixen la mateixa seqüència. S'indica la posició genòmica del pre-miRNA. La seqüència dels miRNA madurs es mostren a la dreta. La seqüència llavor de família GAGGTAG, present en tots els membres, s'utilitza per a definir els membres de la família *let-7* i té implicacions funcionals per determinar els transcrits diana. S'ha demostrat que el *let-7* regula l'expressió d'importants gens implicats en el desenvolupament tumoral, com ara *RAS*, *HGMA2* i *MYC*, i s'ha revelat com un important supressor tumoral, cosa que ha fet que sigui un dels miRNA més estudiats.

Micro-RNA	Paper	Gens diana importants en càncer, comprovats experimentalment
miR-26a	TS	ciclina D2, ciclina E2
miR-15a, miR-16-1	TS	BCL2
let-7 (família)	TS	RAS família, HGMA2, MYC, CDK6, CDC25
miR-34 (família)	TS	E2F3, CDK4, CDK6, CCNE2, BIR3, DCR3, BCL2
miR-17-92-1	OG	E2F família
miR-21	OG	PTEN, TPM1, PDCD4
miR-155	OG	TP53INP1
miR-372, miR-373	OG	LAST2



en alguns tumors humans, com ara el de Wilms, el neuroblastoma i alguns carcinomes de pit, de fetge i de còlon. D'atra banda, la sobreexpressió de HiWi (que pertany al grup de proteïnes Argonauta implicades en el manteniment de la línia germinal) ha estat relacionada, entre d'altres, amb tumors germinals.

Els miRNA es poden classificar en oncogens o en supressors de tumors, segons que promouguin o impedeixin el desenvolupament tumoral. La **taula 1** exposa alguns dels miRNA relacionats amb el càncer més representatius i el seu paper regulador de proteïnes clau en el desenvolupament tumoral. No obstant això, atès que els efectes dels miRNA són intrínsecament pleotrópics, aquesta classificació s'hauria de considerar flexible.

Els miRNA i el seu futur ús en clínica: diagnòstic, pronòstic i teràpia

Encara que l'era dels miRNA va començar fa només uns quants anys, sembla oferir grans promeses per al diagnòstic, per al pronòstic i per a la teràpia en medicina. El ràpid desenvolupament de tècniques per a analitzar-los i estudiar-los, com ara les micromatrius de miRNA (*miRNA microarrays*), els perfils de miRNA basats en la tecnologia de comptes, les PCR quantitatives de miRNA i les tecnologies antisentit, s'espera que tingui, a curt termini, un impacte important en la clínica oncològica.

Atès que els miRNA tenen un paper important en la determinació de la identitat cel·lular, es va pensar que podrien ser útils en el diagnòstic del càncer. Els perfils d'expressió de miRNA podrien permetre d'identificar patrons únics per discernir entre cèl·lules tumorals i d'altres que no ho són. De fet, els perfils d'expressió de miRNA semblen més informatius per a classificar les mostres pel seu origen tissular, per la seva capacitat de generar tumors i pel seu grau de diferenciació que no pas els perfils emprats tradicionalment. Així, per exemple, en un estudi recent el perfil de només 200 miRNA va ser suficient per classificar tumors poc diferenciats amb més precisió que utilitzant 16.000 RNAm. Un altre estudi va aconseguir classificar, amb una precisió sorprenent, el teixit d'origen de 400 mostres tumorals de 22 tipus de teixit diferents. En la mateixa línia, un altre treball va mostrar l'efectivitat dels miRNA com a biomarcadors per determinar el teixit d'origen de càncers d'origen desconegut, un problema freqüent en clínica.

Però els perfils d'expressió dels miRNA també forneixen una informació valuosa sobre el pronòstic dels pacients. Així, per exemple, es va trobar que els perfils de miRNA es correlacionaven amb la supervivència d'adenocarcinomes de pulmó. D'aquesta manera, nivells baixos d'expressió de la família miRNA let-7 (**figura 3**)

estaven relacionats amb un pronòstic pitjor. En un altre estudi en càncer de pulmó es van relacionar nivells alts de miR-221 i de let-7a amb una certa protecció, mentre que nivells alts de miR-137, de miR-372 i de miR-182 es van relacionar amb un pronòstic pitjor. A més, els nivells d'aquests miRNA van ser útils per predir una recaiguda tumoral. En la mateixa línia, un altre estudi va mostrar que nivells alts d'expressió de miR-21 s'associaven a un pronòstic pitjor i a una baixa resposta terapèutica.

Altres experiments han posat en relleu la possible utilitat terapèutica dels miRNA. Per exemple, en models animals s'ha trobat una eficàcia en experiments de teràpia gènica que restitueixen la funció dels miRNA supressors. D'altra banda, la inhibició de l'activitat de miRNA oncogènics també ha demostrat que té un efecte terapèutic. Aquests experiments es basen en tecnologies d'oligonucleòtids antisentit que poden bloquejar específicament l'activitat patogènica. Aquests anti-miR (anomenats *antagomirs*) són

oligonucleòtids complementaris de la seqüència dels miRNA amb modificacions químiques que en milloren l'estabilitat i/o l'absorció. Entre les modificacions més utilitzades es troben: la substitució de l'enllaç fosfat per l'enllaç fosforotioat, la metilació del segon oxigen de l'anell de la ribosa o l'addició d'un enllaç pont addicional entre dos carbonis de l'anell de la ribosa (*locked nucleic acid*, LNA). Els anti-miR han estat molt útils en assajos funcionals per determinar les repercussions biològiques de la inhibició de miRNA específics. Tot i que hi ha alguns estudis que han mostrat la seva eficàcia en models *in vivo*, aquesta tècnica s'ha utilitzat freqüentment en cultiu de teixits. Les proves fetes en ratolins han donat resultats esperançadors en tots els teixits, llevat del cervell. Atès que cada miRNA té múltiples dianes, la utilització de fàrmacs inhibidors podria causar efectes secundaris. Malgrat aquests possibles contratemps, intrínsecs a la recerca mateixa, les aplicacions clíniques dels miRNA llancen una esperança prometedora que serà sens dubte d'utilitat per al futur. |

Referències bibliogràfiques

- GLEAVE, M. E.; MONIA, B. P. (2005). «Antisense therapy for cancer». *Nature Reviews in Cancer*, vol. 5, p. 468.
- GRIMM, D. [et al.] (2006). «Fatality in mice due to oversaturation of cellular micro-RNA/short hairpin RNA pathways». *Nature*, vol. 441, p. 537.
- KUMAR, M. S. [et al.] (2008). «Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 micro-RNA family». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 105, p. 3903.
- LEWIS, B. P. [et al.] (2005). «Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are micro-RNA targets». *Cell*, vol. 120, p. 15.
- LU, J. [et al.] (2005). «Micro-RNA expression profiles classify human cancers». *Nature*, vol. 435, p. 834.
- MEDINA, P. P.; SLACK, F. J. (2008). «Micro-RNAs and cancer: an overview». *Cell Cycle*, vol. 7, p. 2485.
- MEDINA, P. P. [et al.] (2010). «OncomiR addition in an in vivo model of micro-RNA-21-induced pre-B-cell lymphoma». *Nature*, vol. 467, p. 86.
- MEDINA, P. P. [et al.] (2010). «Regression of murine lung tumors by the let-7 micro-RNA». *Oncogene*, vol. 29, p. 1580.
- SCHETTER, A. J. [et al.] (2008). «Micro-RNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma». *Journal of the American Medical Association*, vol. 299, p. 425.
- STARK, A. [et al.] (2005). «Animal micro-RNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3' UTR evolution». *Cell*, vol. 123, p. 1133.
- TAVAZOIE, S. F. [et al.] (2008). «Endogenous human micro-RNAs that suppress breast cancer metastasis». *Nature*, vol. 451, p. 147.
- WIGHTMAN, B. [et al.] (1993). «Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*». *Cell*, vol. 75, p. 855.
- YANAIHARA, N. [et al.] (2006). «Unique micro-RNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis». *Cancer Cell*, vol. 9, p. 189.
- YEKTA, S. [et al.] (2004). «Micro-RNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA». *Science*, vol. 304, p. 594.

Pedro Medina

(Granada, 1978)



Es va llicenciar a la Universitat de Granada i es va doctorar al Centre Nacional d'Investigacions Oncològiques, de la Universitat Autònoma de Madrid. Va fer cinc anys d'estudis postdoctorals a la Universitat de Yale. És membre de la Reial Acadèmia de Medicina de Catalunya. Actualment és professor del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular I de la Universitat de Granada i lidera un grup de recerca al Centre de Recerca Genòmica i Oncològica (www.genyo.es). Pàgina web: <http://www.ugr.es/~pedromedina>.