

RUOLO FUNZIONALE DEI MICRORNA NEL MELANOMA: DIAGNOSI, PROGNOSI E POSSIBILITÀ TERAPEUTICHE

Federica Felicetti, Nadia Felli, Maria Cristina Errico, Marina Petrini, Annamaria Lustri, Maria Bellenghi, Alessandra De Feo, Lisabianca Bottero, Gianfranco Mattia, Alessandra Carè
Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

I microRNA (miR) sono RNA non codificanti (22-25 basi) in grado di regolare a livello post-trascrizionale l'espressione genica di specifici mRNA mediante appaiamento a sequenze specifiche nel 3'UTR dei geni bersaglio (1). Numerosi studi hanno dimostrato il coinvolgimento funzionale dei microRNA in tutti i principali processi biologici, inclusa l'insorgenza di patologie tumorali derivante da una loro espressione anomala (2). Il primo microRNA, lin-4, capace di reprimere l'espressione del gene eterocronico lin-14 venne scoperto in *C. elegans* nel 1998. Da quel momento in poi, la nostra conoscenza sui miR è aumentata esponenzialmente e, ad oggi, ne sono stati identificati nell'uomo circa 900 (nel genoma di un vertebrato ne sono stati stimati circa 1.000). Nel 2002, studi su cellule B di pazienti affetti da leucemia linfatica cronica, portarono all'identificazione delle sequenze codificanti per i miR-15 e -16 localizzate in una regione genomica sul cromosoma 13 (13q14.3) ad alta frequenza di delezione in questa patologia (3). Analisi successive hanno poi dimostrato come questi due miR esplicano la loro funzione antitumorale attraverso l'attivazione del segnale apoptotico, il silenziamento del fattore BCL-2 (4) e il blocco del ciclo cellulare (5). Una situazione opposta è stata verificata per il cluster dei microRNAs 17-92, un gruppo di oncomiR (miR-17, miR-18, miR-19a, miR-19b e miR-92) localizzato in un'altra regione del cromosoma 13 (13q31.3), frequentemente amplificata e coinvolta nell'insorgenza e nella progressione di numerosi tipi di cancro, come linfomi e tumori polmonari (6-8).

L'evidenza che i miR possano funzionare come oncogeni o *tumor suppressor genes* ha generato enormi aspettative sul loro possibile utilizzo in terapia oncologica, anche in considerazione della loro modesta tossicità, in quanto molecole fisiologiche (9). Tali prospettive sono state avvalorate dai risultati positivi ottenuti *in vitro* e *in vivo* in appropriati modelli animali mediante riespressione o trasduzione di oligomeri antisenso (10). Inoltre, attraverso l'analisi dei profili di espressione genica (Trascrittoma e miRNoma) acquisiti mediante la tecnica del *microarray*, è stato possibile identificare non solo geni selettivamente modulati nel programma genetico della cellula neoplastica rispetto alla controparte normale, ma anche di discriminare sottogruppi di pazienti fenotipicamente indistinguibili. Nel caso del melanoma uveale i profili di espressione ottenuti hanno già dimostrato la capacità diagnostica e prognostica dei microRNA. Infatti per questa patologia sei microRNA (miR-146b, -214, -199a*, -199a, -143, let-7b) sono sufficienti a distinguere con il 100% di specificità il sottogruppo di pazienti ad alto rischio di metastatizzazione da quelli a basso rischio (11).

È evidente come un'adeguata caratterizzazione dei profili molecolari sia un elemento fondamentale per un corretto trattamento dei pazienti, escludendo soggetti non rispondenti ai criteri richiesti ed evitando trattamenti inutilmente costosi e con pesanti effetti collaterali se non fortemente motivati.

I nostri studi si sono focalizzati sull'analisi di espressione e funzione dei microRNA nel melanoma cutaneo, una forma tumorale molto aggressiva la cui incidenza è in continuo costante aumento con una stima approssimativa di 10.000 nuovi casi l'anno in Italia. Ad oggi la diagnosi precoce e l'escissione chirurgica rappresentano l'unico approccio terapeutico veramente valido, risolutivo nelle fasi iniziali della malattia. Non esistono invece terapie soddisfacenti dopo disseminazione metastatica. Infatti, l'introduzione di nuovi farmaci, in associazione o meno con l'immunoterapia, non ha portato all'identificazione di trattamenti veramente efficaci. Tra l'altro, nonostante numerose anomalie molecolari siano state associate alla progressione del melanoma, non è chiaro quali siano le molecole realmente rilevanti dal punto di vista funzionale (12). È evidente quindi quanto sia importante definire i marcatori con un vero valore diagnostico e prognostico all'interno dei *pathway* coinvolti nell'insorgenza e nella progressione neoplastica con la speranza di ottenere risultati clinici più incoraggianti attraverso trattamenti complessi che prevedano la somministrazione contemporanea di agenti tradizionali e farmaci di nuova generazione a bersaglio molecolare, inclusa la riespressione o l'abrogazione di microRNA.

Stato di sviluppo

Attraverso l'analisi dei profili di espressione di microRNA ottenuti confrontando melanociti primari umani con un pannello di linee cellulari stabilizzate da melanomi a diversi stadi di progressione abbiamo identificato tre sottogruppi di miR: i) miR ad espressione costante; ii) miR inversamente associati alla progressione; iii) miR direttamente correlati alla progressione neoplastica, come i miR-221/-222.

Inizialmente abbiamo focalizzato la nostra attenzione sui miR-221 e -222, la cui espressione è risultata assente nei melanociti normali e significativamente correlata con la progressione nei melanomi primari e metastatici (13). Questi due microRNA sono organizzati in tandem sul cromosoma X e sono trascritti in un unico precursore che va successivamente incontro alle corrette fasi maturative da parte degli enzimi Dicer e Drosha per dare origine ai due microRNA maturi.

Ad oggi i microRNA-221/222 sono i più studiati in associazione a diverse forme tumorali essendo il loro aumento di espressione presente tra gli altri nel carcinoma della tiroide, epatocarcinoma, glioblastoma e carcinoma polmonare non a piccole cellule (14, 15, 16, 17). In particolare nel melanoma abbiamo dimostrato che l'espressione incontrollata dei miR-221/-222 è alla base della regolazione negativa di p27Kip1, un inibitore delle chinasi ciclina-dipendenti, e del recettore c-kit, coinvolto nell'attivazione del *pathway* che porta al normale differenziamento e alla produzione della melanina. Attraverso la repressione di questi due geni bersaglio, i miR-221/-222 sono quindi capaci di indurre un aumento della proliferazione cellulare e un blocco della melanogenesi (13). È molto interessante sottolineare come gli "oncomir"-221 e -222 abbiano tra i target proteine con funzione soppressiva, PTEN e TIMP3 (17), regolatori negativi del ciclo cellulare, p27 e p53 (13, 18), e regolatori del differenziamento, come il recettore c-KIT nel melanoma (13) (Figura 1).

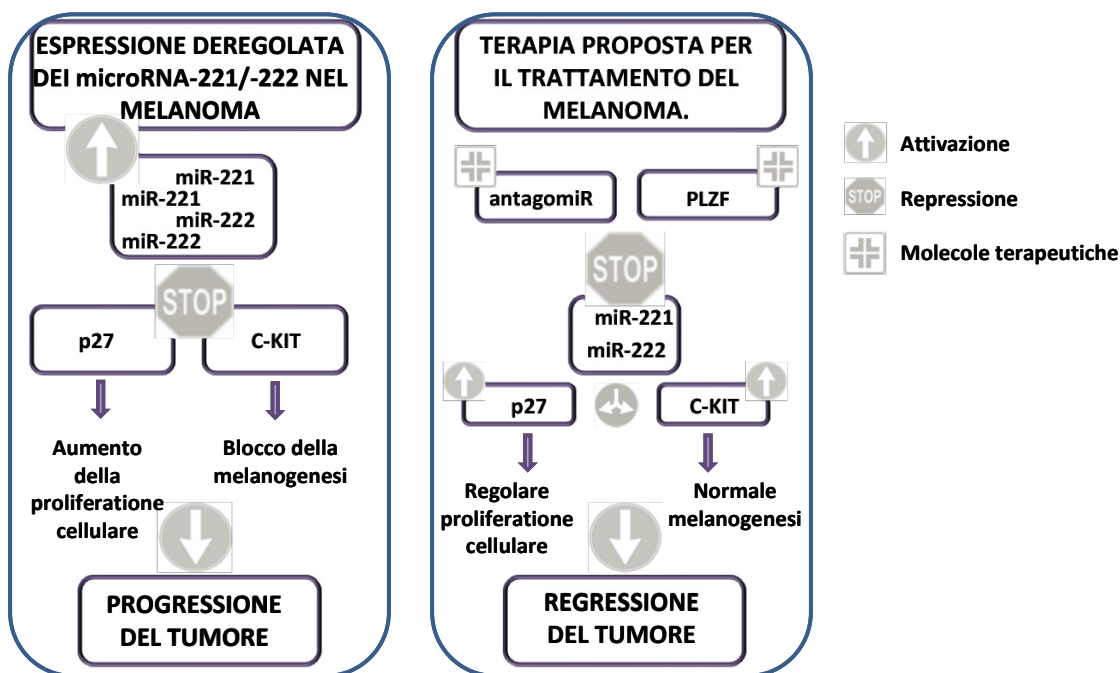


Figura 1. MicroRNA-221/-222 nel melanoma

Nella Figura 1 l'espressione dei microRNA-221/-222 correla significativamente con la progressione del tumore attraverso la regolazione negativa di p27Kip1 e del recettore c-kit. I miR-221/-222 inducono un aumento della proliferazione cellulare e un blocco della melanogenesi mediante la repressione di questi due geni bersaglio.

Esperimenti *in vitro* e dati preliminari *in vivo* effettuati mediante trattamento con antagomir hanno confermato il potenziale prometastatico dei miR-221/-222 e la sua riduzione derivante dal loro silenziamento. Gli antagomir sono oligomeri antisense stabilizzati da gruppi metilici 2'-OMe e veicolati da una molecola di colosterolo coniugata in 3'. Le sequenze sono complementari ai miR maturi (19).

Trattando una linea di melanoma metastatico (Me665/1) con antagomir-221 e -222 abbiamo ottenuto una significativa riduzione della malignità cellulare (riduzione del 70% di crescita, invasione, migrazione e capacità di formare foci in agar). Successivamente il trattamento *in vivo* ha confermato un significativo rallentamento della crescita sia di noduli sottocutanei, conseguente ad inoculo sottocute delle cellule di melanoma (20) (Figura 2), sia del numero e della grandezza delle metastasi polmonari ottenute in seguito ad inoculo intravena di cellule A375M, variante metastatica delle A375 parentali.

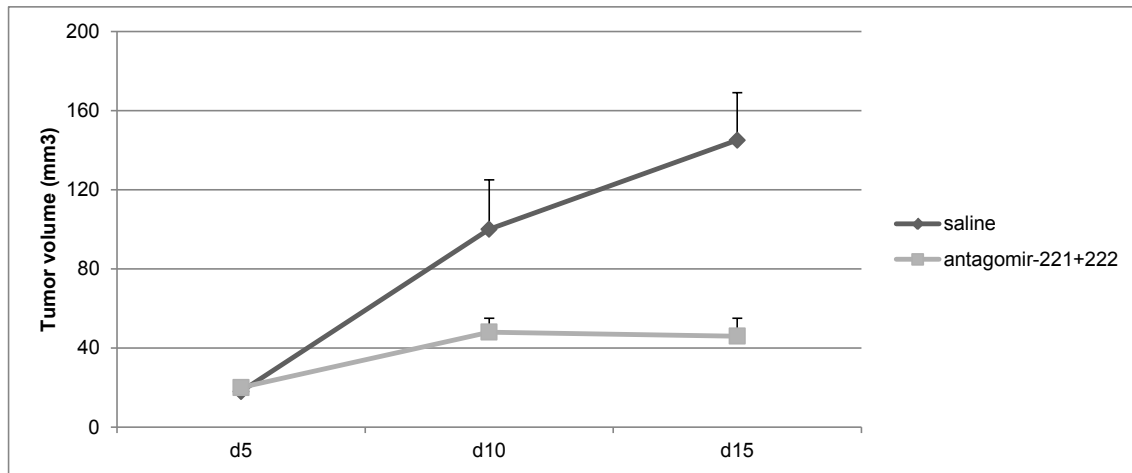


Figura 2. Effetti del trattamento con antagomir 221+222 sulla crescita tumorale *in vivo*. Topi nudi atimici sono stati trattati intratumore con i due antagomir una settimana dopo l'inoculo sottocute di cellule della linea metastatica A375M

Il nostro studio ha inoltre contribuito a chiarire alcuni aspetti sulla regolazione trascrizionale dei microRNA-221 e -222, fino ad allora poco conosciuta. In questo contesto, un ruolo chiave è svolto dalla proteina PLZF (*Promyelocytic Leukemia Zinc Finger*), un fattore trascrizionale inizialmente descritto come proteina di fusione con il recettore per l'acido retinoico in un sottogruppo della leucemia promielocitica acuta (21). Successivamente, attraverso i nostri studi avevamo dimostrato come il suo silenziamento fosse associato al melanoma e la sua riespressione fosse capace di ridurre il grado di malignità delle cellule trasdotte attraverso la repressione dei miR-221/-222 per legame diretto alle sequenze consensus presenti sulla regione del promotore putativo (22). Abbiamo quindi ipotizzato un modello "PLZF - miR-221/-222 - "geni bersaglio", in cui PLZF fosse in grado di reprimere l'espressione dei due microRNA. Analisi bioinformatiche nel locus genomico di questi RNA, hanno confermato la presenza di sequenze di legame per PLZF mentre, la regolazione negativa, è stata dimostrata sperimentalmente attraverso saggi di luciferasi e PCR quantitativa. In accordo con questo risultato, la trasduzione di PLZF nei melanomi induce la regressione del fenotipo maligno attraverso l'abrogazione dei miR-221/-222 (Figura 1).

Un altro aspetto importante è rappresentato dalla presenza di microRNA circolanti, il livello dei quali è valutabile nel siero e nel plasma dei pazienti. Queste molecole mostrano una notevole stabilità intrinseca, ulteriormente incrementata quando veicolate da esosomi, microvescicole rilasciate nell'ambiente extracellulare capaci di trasferire molecole (RNA, microRNA e proteine) ed "informazioni" da una cellula all'altra. Tale stabilità consente l'estrazione di RNA da materiale d'archivio per analisi retrospettive che confermino la validità diagnostica e/o prognostica di singoli microRNA, attraverso una procedura assolutamente non invasiva (23). Tra gli altri, anche il miR-221 è risultato essere un marcatore in pazienti affetti da carcinoma del colon-retto in grado di distinguere i pazienti dai controlli con un buon valore prognostico sulla sopravvivenza (24). Gli esosomi sono vescicole con diametro di 30-100 nm, secrete nell'ambiente extracellulare praticamente da tutte le cellule, normali e trasformate, e rilasciate all'esterno mediante la fusione di questi organelli con la membrana plasmatica. Nello stesso modo, attraverso un meccanismo di fusione, gli esosomi sono in grado di rientrare in cellule riceventi in modo autocrino o paracrino. In accordo con questo meccanismo, nel melanoma abbiamo dimostrato la capacità di trasferimento genico orizzontale da parte degli esosomi. Infatti, esosomi rilasciati da un melanoma metastatico

sono risultati in grado di aumentare la malignità di un melanoma primario in seguito a fusione delle membrane cellulari e trasferimento di proteine e acidi nucleici funzionalmente rilevanti nella metastatizzazione (19). Infine è importante evidenziare l'esistenza di meccanismi di *cross-talk* molecolari tra cellule di melanoma e cellule del microambiente cellulare, incluse cellule endoteliali e del sistema immunitario (25).

Conclusioni e prospettive future

La famiglia dei microRNA costituisce un nuovo livello di regolazione e una fonte alla quale attingere alla ricerca di nuovi marcatori e possibili bersagli terapeutici. Lo studio dei profili di espressione ha già dimostrato l'esistenza di *pattern* molto specifici e di conseguenza l'opportunità di utilizzare i microRNA come *marker* terapeutici (26). Ad oggi stiamo raggiungendo una comprensione sempre maggiore sul ruolo dei microRNAs nello sviluppo tumorale, ma molto è ancora da comprendere. In generale una delle maggiori difficoltà è rappresentata dalla complessità funzionale poiché l'azione di un singolo microRNA influenza più geni e allo stesso tempo un singolo gene risulta essere controllato da più microRNA. L'espressione ectopica o il *knock-down* di miRNA specifici hanno consentito di individuare i punti chiave del loro ruolo nell'oncogenesi. Una conoscenza approfondita consentirà di ripristinare la normale regolazione cellulare *in vitro* e *in vivo* in opportuni modelli animali ponendo le basi per futuri protocolli terapeutici.

I dati ottenuti su diversi tipi di neoplasie evidenziano il potenziale diagnostico, prognostico e terapeutico dei microRNA, con particolare riferimento ai miR-221/-222 nel melanoma. Sebbene l'abrogazione dei miR-221/-222 e la riduzione del fenotipo maligno possano essere ottenuti attraverso la riespressione del fattore di trascrizione PLZF, i limiti intrinseci della terapia genica sembrano rendere questa strada difficilmente percorribile. Al contrario, il silenziamento dei microRNA-221 e -222 attraverso l'utilizzo di oligomeri antisenso potrebbe in futuro rivelarsi un metodo sicuro ed efficace per approcci terapeutici innovativi. Inoltre l'evidenza di microRNA circolanti, valutabili nel siero e nel plasma dei pazienti, rappresenta una procedura assolutamente non invasiva (27) che consente, tra l'altro, l'utilizzo di materiale d'archivio per analisi retrospettive. Tra gli altri, proprio il miR-221 è risultato essere un buon marcatore in pazienti affetti da carcinoma del colon (24). I microRNA circolanti nel plasma sono risultati stabili e resistenti in condizioni particolari (temperatura elevata, variazioni di pH, lunghi periodi di conservazione e congelamento). Una delle ipotesi più accreditate per spiegare queste caratteristiche è che questi microRNA siano contenuti all'interno di piccole vescicole, gli esosomi, che li proteggono dai fattori esterni, primo tra tutti l'azione delle RNasi. Gli esosomi (e le molecole in essi contenute) riflettono i cambiamenti fisiologici e patologici delle cellule da cui hanno origine e possono dunque essere usati come *biomarker* tumorali (28).

Studi recenti hanno anche mostrato l'esistenza di regolazioni epigenetiche dei microRNA. In questi casi sarà possibile ripristinare l'espressione di microRNA con funzioni soppressive ipermetilati nel cancro mediante l'uso di farmaci demetilanti e di inibitori delle HDAC (29). Infine lo sviluppo di kit di facile e veloce utilizzo per l'analisi di espressione dei microRNA nonché la creazione di algoritmi sempre più validi per l'identificazione dei veri geni target saranno comunque tappe indispensabili per un eventuale trasferimento nella pratica clinica (20).

In conclusione si può ipotizzare che, in un futuro non troppo lontano, i microRNA potranno essere alla base di nuove strategie terapeutiche, la ricerca delle quali è particolarmente rilevante nel melanoma, un tumore per il quale, nonostante gli sforzi fatti, i risultati ottenuti non sono ancora soddisfacenti.

Bibliografia

1. Ghildiyal M, Zamore PD. 2009 Feb;10(2):94-108. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet* 2009;10:94-108.
2. Shenouda SK, Alahari SK. MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev* 2009;28:369-78.
3. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:15524-9.
4. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM.. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by *targeting* BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:13944-9.
5. Calin GA, Cimmino A, Fabbri M, Ferracin M, Wojcik SE, Shimizu M, Taccioli C, Zanesi N, Garzon R, Aqeilan RI, Alder H, Volinia S, Rassenti L, Liu X, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:5166-71.
6. Ota A, Tagawa H, Karnan S, Tsuzuki S, Karpas A, Kira S, Yoshida Y, Seto M. Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res* 2004;64:3087-95.
7. Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, Yatabe Y, Kawahara K, Sekido Y, Takahashi T. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res* 2005;65:9628-32.
8. Olive V, Jiang I, He L. mir-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42:1348-54.
9. Garofalo M, Croce CM. microRNAs: Master regulators as potential therapeutics in cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2011;51:25-43.
10. Kota SK, Balasubramanian S. Cancer therapy via modulation of micro RNA levels: a promising future. *Drug Discovery Today* 2010;15(17-18):733-40.
11. Worley LA, Long MD, Onken MD, Harbour JW. Micro-RNAs associated with metastasis in uveal melanoma identified by multiplexed microarray profiling. *Melanoma Res* 2008;18:184-90.
12. Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new target therapy. *Nature* 2007;445:851-7.
13. Felicetti F, Errico MC, Bottero L, Segnalini P, Stoppacciaro A, Biffoni M, Felli N, Mattia G, Petrini M, Colombo MP, Peschle C, Carè A. The promyelocytic leukemia zinc finger-microRNA-221/-222 *pathway* controls melanoma progression through multiple oncogenic mechanisms. *Cancer Res* 2008;68:2745-54.
14. Pallante P, Visone R, Croce CM, Fusco A. Deregulation of microRNA expression in follicular-cell-derived human thyroid carcinomas. *Endocr Relat Cancer* 2010;17:F91-104.
15. Wong QW, Ching AK, Chan AW, Choy KW, To KF, Lai PB, Wong N. MiR-222 overexpression confers cell migratory advantages in hepatocellular carcinoma through enhancing AKT signaling. *Clin Cancer Res* 2010;16:867-75.
16. Ciafrè SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, Sabatino G, Negrini M, Maira G, Croce CM, Farace MG. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;334:1351-8.

17. Garofalo M, Di Leva G, Romano G, Nuovo G, Suh SS, Ngankea A, Taccioli C, Pichiorri F, Alder H, Secchiero P, Gasparini P, Gonelli A, Costinean S, Acunzo M, Condorelli G, Croce CM. MiR-221&222 Regulate TRAIL Resistance and Enhance Tumorigenicity through PTEN and TIMP3 Downregulation. *Cancer Cell* 2009;16:498-509.
18. Fornari F, Gramantieri L, Ferracin M, Veronese A, Sabbioni S, Calin GA, Grazi GL, Giovannini C, Croce CM, Bolondi L, Negrini M. MiR-221 controls CDKN1C/p57 and CDKN1B/p27 expression in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2008;27:5651-61.
19. Felicetti F, Parolini I, Bottero L, Fecchi K, Errico MC, Raggi C, Biffoni M, Spadaro F, Lisanti MP, Sargiacomo M, Carè A. Caveolin-1 tumor-promoting role in human melanoma. *Int J Cancer* 2009;125:1514-22.
20. Felicetti F, Errico MC, Segnalini P, Mattia G, Carè A. MicroRNA-221 and -222 pathway controls melanoma progression. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008;8:1759-65.
21. Licht JD, Chomienne C, Goy A, Chen A, Scott AA, Head DR, Michaux JL, Wu Y, DeBlasio A, Miller Jr WH, Zelenetz AD, Willman CL, Chen Z, Chen S-J, Zelent A, Macintyre E, Veil A, Corets J, Kantarjian H and Waxman S. Clinical and molecular characterization of a rare syndrome of acute promyelocytic leukemia associated with translocation (11;17). *Blood* 1995;85:1083-94.
22. Felicetti F, Bottero L, Felli N, Mattia G, Labbaye C, Alvino E, Peschle C, Colombo MP and Carè A. Role of PLZF in melanoma progression. *Oncogene* 2004;23:4567-76.
23. Ohshima K, Inoue K, Fujiwara A, Hatakeyama K, Kanto K, Watanabe Y, Muramatsu K, Fukuda Y, Ogura S, Yamaguchi K, Mochizuki T. Let-7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line. *PLoS One* 2010;5:e13247.
24. Pu XX, Huang GL, Guo HQ, Guo CC, Li H, Ye S, Ling S, Jiang L, Tian Y, Lin TY. Circulating Mir-221 directly amplified from plasma is a potential diagnostic and prognostic marker of colorectal cancer and is orrelated with P53 expression. *J Gastroenterol Hepatol* 2010;25:1674-80.
25. Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int* 2010;78:838-48.
26. Cho WC. MicroRNAs: potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and targets for therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42:1273-81.
27. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011;11:426-37.
28. Brase JC, Wuttig D, Kuner R, Sultmann H. Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer. *Mol Cancer* 2010;9:306.
29. Bandres E, Agirre X, Bitarte N, Ramirez N, Zarate R, Roman-Gomez J, Prosper F, Garcia-Foncillas J. Epigenetic regulation of microRNA expression in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2009;125:2737-43.