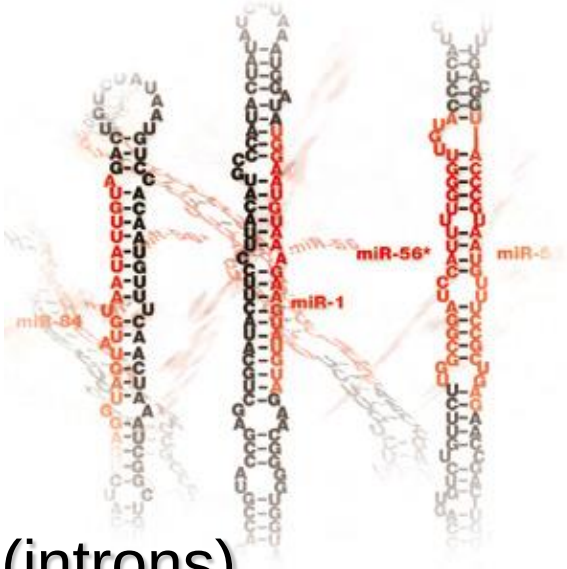
Expressió i quantificació de miRNA en el teixit pulmonar neoplàsic i en la circulació perifèrica

Beca SOCAP 2009

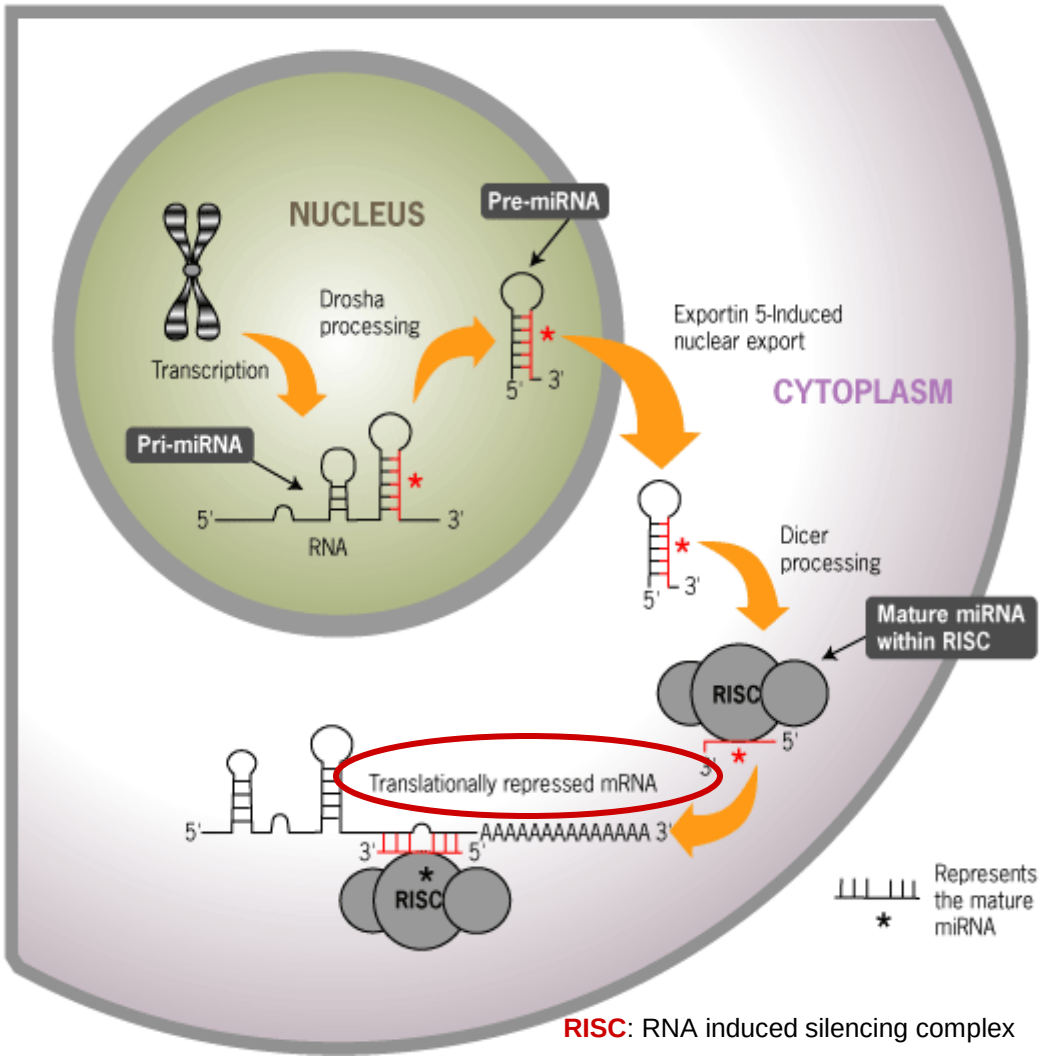
IP Dr. Ramon Mª Marrades

Micro RNA (miRNA)



- Petites molècules de RNA
  no codificant de uns 22 nucleòtids (introns).
- Regulen l'expressió (traducció) de RNAm.
- Els miRNAs tenen diferents patrons d'expressió als diferents teixits.
- S'identifiquen mitjançant les tècniques habituals de detecció de RNA.

microRNA biogenesis



RISC: RNA induced silencing complex

miRNA gen
(intron o region intergénica)

↓

Primary miRNA

↓ **Drosha**

Precursor miRNA

↓ **Dicer**

Maduro miRNA

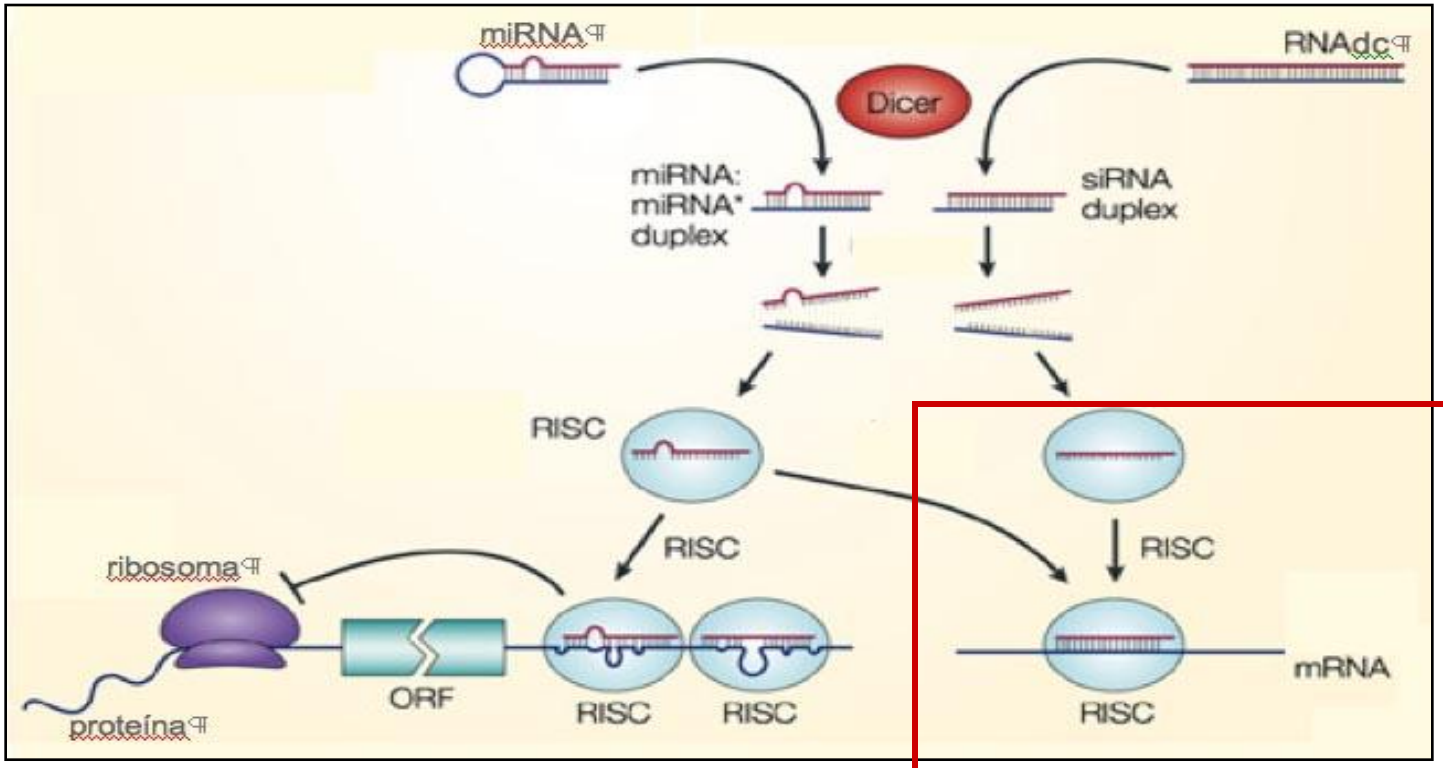
↓

miRNA + RISC

↓ -

Mensajero RNA

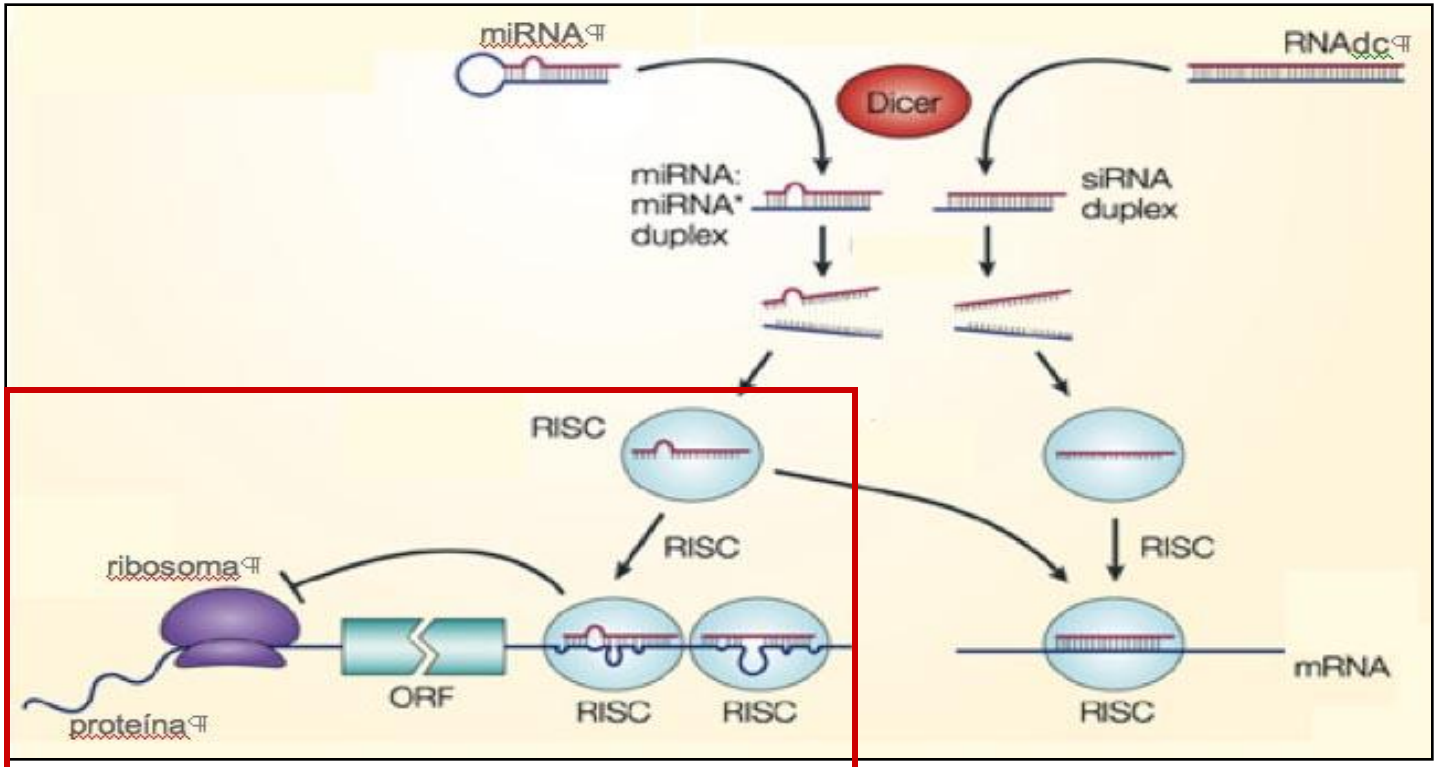
miRNA mecanismes i funció



Translation repression

Degradació del mRNA

miRNA mecanismes i funció



Repressió de la traducció

mRNA degradation

Regulació negativa de l'expressió gènica a nivell post-transcripcional

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

REVIEW ARTICLE

MOLECULAR ORIGINS OF CANCER

Oncogenes and Cancer

Carlo M. Croce, M.D.

CANCER IS CAUSED BY ALTERATIONS IN ONCOGENES, TUMOR-SUPPRESSOR genes, and microRNA genes. These alterations are usually somatic events, although germ-line mutations can predispose a person to heritable or familial cancer. A single genetic change is rarely sufficient for the development of a malignant tumor. Most evidence points to a multistep process of sequential alterations in several, often many, oncogenes, tumor-suppressor genes, or microRNA genes in cancer cells.

Adding fuel to fire: microRNAs as a new class of mediators of inflammation

F J Sheedy, L A J O'Neill

Ann Rheum Dis 2008;**67**(Suppl III):iii50–iii55.

STATE OF THE ART

nature publishing grou

Clinical Applications for microRNAs in Cancer

SP Nana-Sinkam[1,2,3] and CM Croce[2,3,4]

Clinical Pharmacology and Therapeutics

VOLUME 93 NUMBER 1 | JANUARY 2013 | www.nature.com/cpt

Eur Respir J 2013; 41: 695–705
DOI: 10.1183/09031936.00212011

REVIEW

MicroRNAs and respiratory diseases

Hitasha Rupani, Tilman Sanchez-Elsner and Peter Howarth

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

ORIGINAL ARTICLE

Treatment of HCV Infection by Targeting MicroRNA

Harry L.A. Janssen, M.D., Ph.D., Hendrik W. Reesink, M.D., Ph.D., Eric J. Lawitz, M.D., Stefan Zeuzem, M.D., Maribel Rodriguez-Torres, M.D., Keyur Patel, M.D., Adriaan J. van der Meer, M.D., Amy K. Patick, Ph.D., Alice Chen, B.A., Yi Zhou, Ph.D., Robert Persson, Ph.D., Barney D. King, M.D., Sakari Kauppinen, Ph.D., Arthur A. Levin, Ph.D., and Michael R. Hodges, M.D.

This article was published on March 27, 2013, at NEJM.org.

N Engl J Med 2013.
DOI: 10.1056/NEJMoa1209026

Introducció

- Factors de transcripció
  - SRY-related HMG box (SOX)2
  - Octamer-binding protein (OCT)4
  - NANOG

  Son factors de transcripció relacionats amb la regulació de les cèl·lules embrionàries i la homeòstasi dels teixits adults
- La seva desregulació s'associa a carcinogènesis al pulmó i al esòfag.
- SOX 2 y OCT4 regula la expressió de miR-367
- L'expressió de miR-145 es regulada per p53

Objectiu

- Determinar l'expressió de miR-367 y miR-145 en teixit tumoral i teixit normal
- Determinar si el gen de p53 esta mutat
- Veure la seva relació amb el pronòstic dels pacients

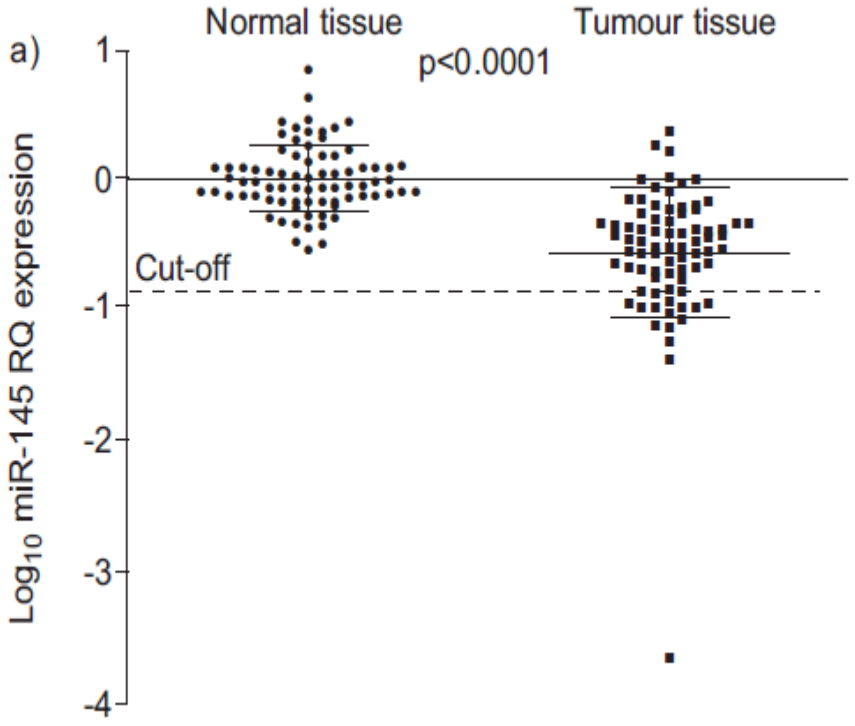
Població

- 70 pacients
- 67 anys [46-83]
- 82% homes, 18% dones
- Tipus histològic
  - 51% ADK
  - 40% c. escatós
  - 9% altres
- Estadiatge
  - I 63%
  - II 17%
  - III 20%
- Tractament quirúrgic

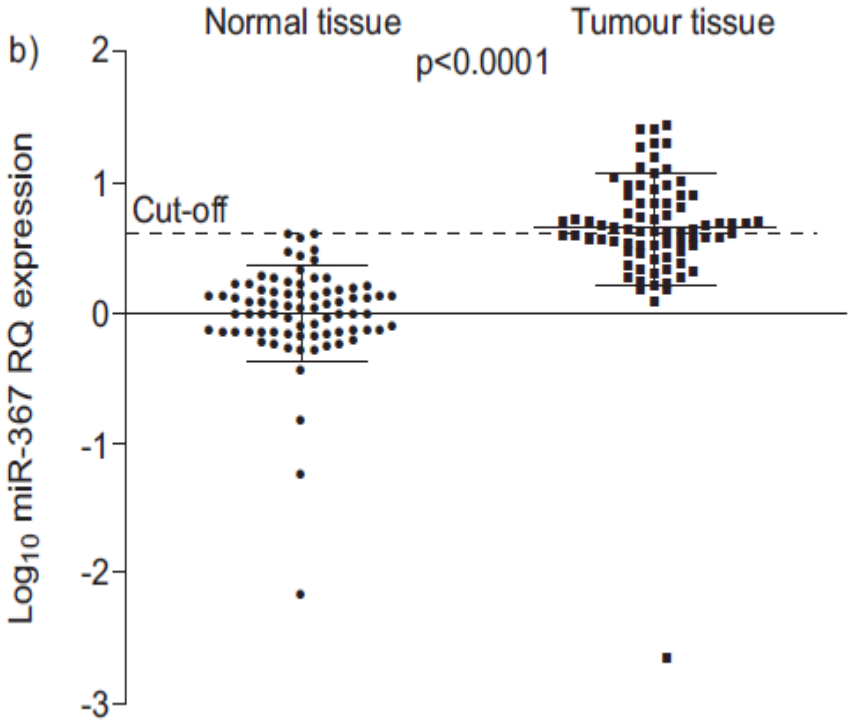
Material i mètodes

- Mostra de tumor i de teixit normal obtingudes immediatament després de la cirurgia
- Mètodes
  - Extracció del RNA i ADN
  - Quantificació de microRNAs
  - Anàlisis de la mutació de p53
  - Evolució clínica
  - Mostra sanguínia abans de la intervenció i en cada control posterior.

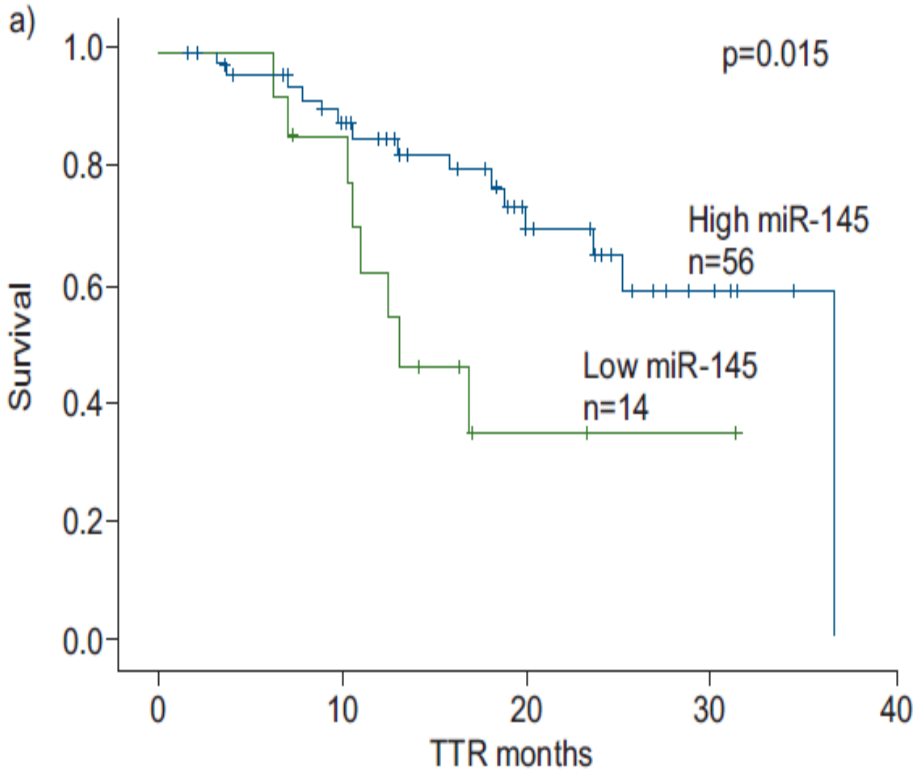
Expressió de miR-145

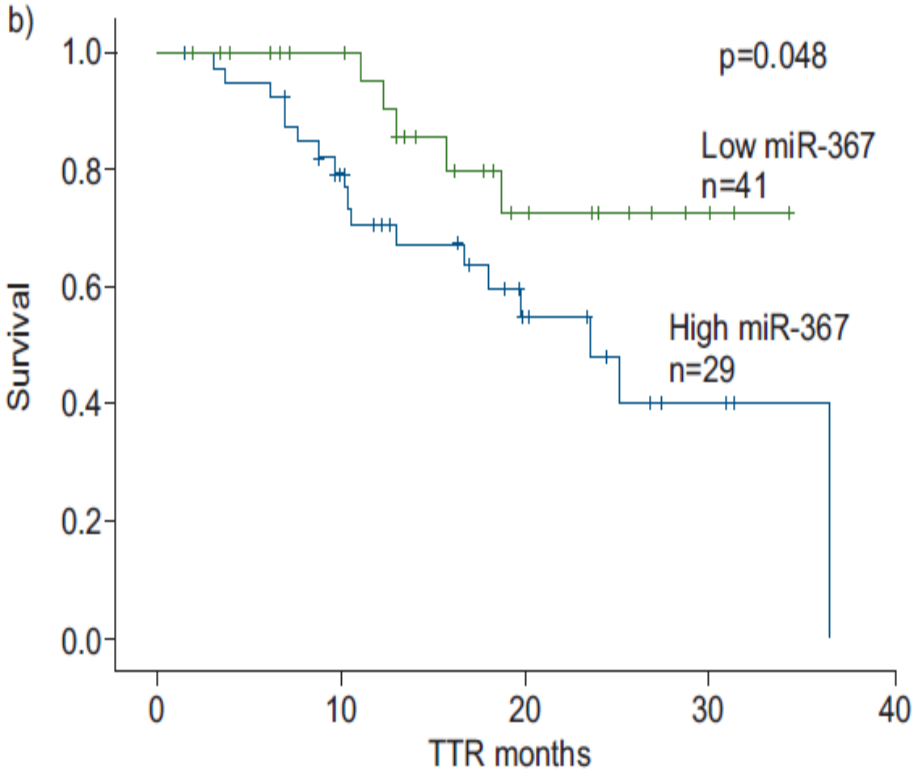


Expressió de miR-367



Relació entre expressió de microRNAs i supervivència





Relació entre expressió de microRNAs i supervivència

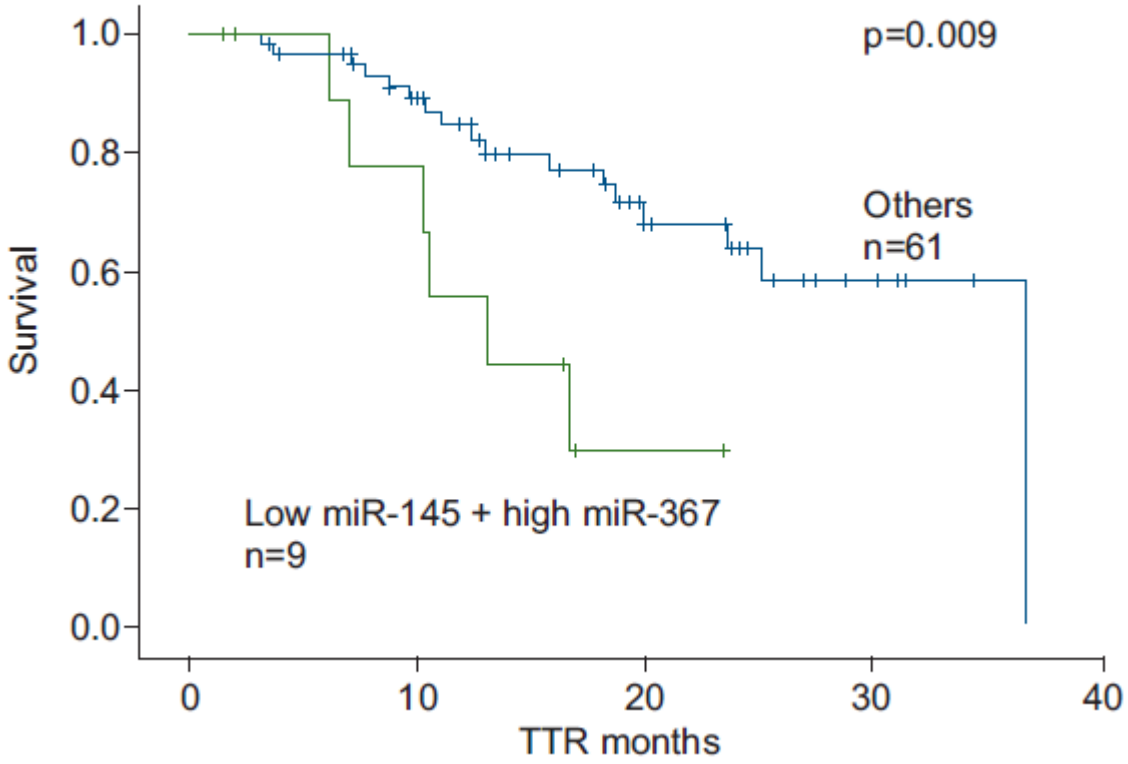
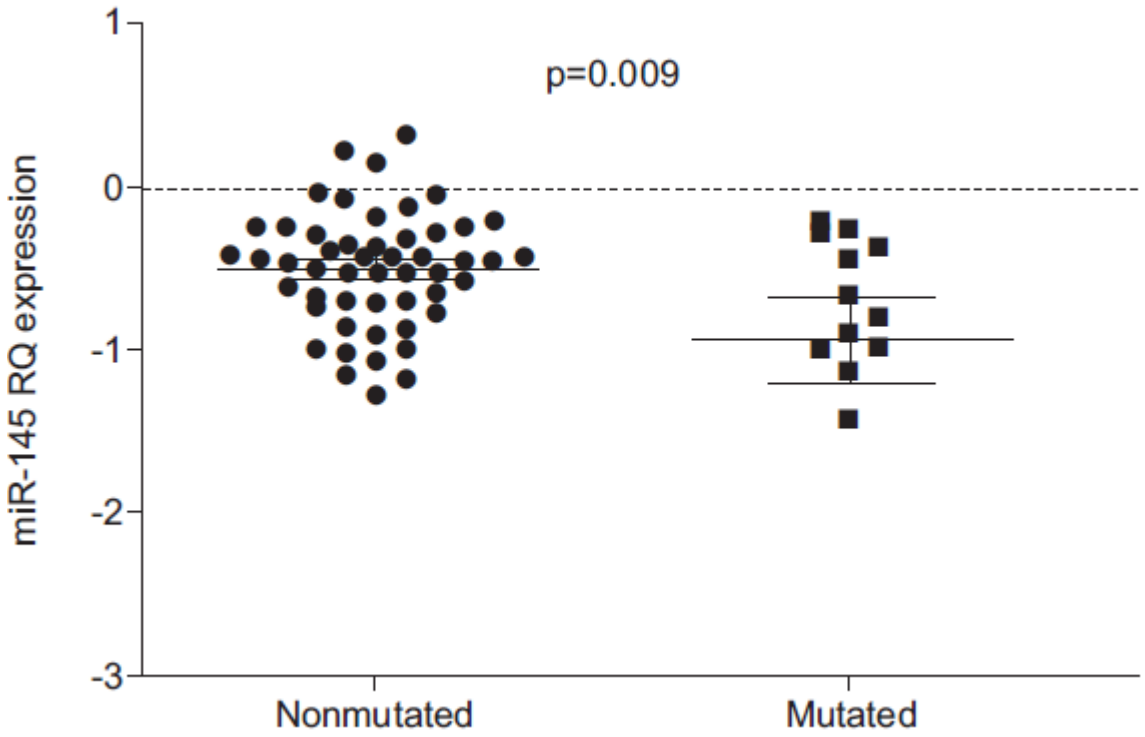


TABLE 2 p53 mutations

Sample	Codon	Nucleotide change	Amino acid change	Exon
07-394	157	GTC>TTC	Val>Phe	5
07-413	141	TGC>GGC	Cys>Gly	5
09-311	157	GTC>TTC	Val>Phe	5
08-647	129	GCC>GTC	Ala>Val	5
07-326	214	CAT>GAT	His>Asp	6
07-306	213	CGA>TGA	Arg>STOP	6
09-310	196	CGA>TGA	Arg>STOP	6
08-008	215	AGT>ATT	Ser>Iso	6
09-022	242	TGC>AGC	Cys>Ser	7
09-213	248	CGG>CAGG	Insertion	7
08-206	272	GTG>GAG	Val>Glu	8
09-327	273	CGT>CTT	Arg>Leu	8
08-562	285	GAG>GTG	Glu>Val	8

Relació entre miR-145 i mutació de p53



Relació entre mutació de p53, expressió de microRNAs i supervivència

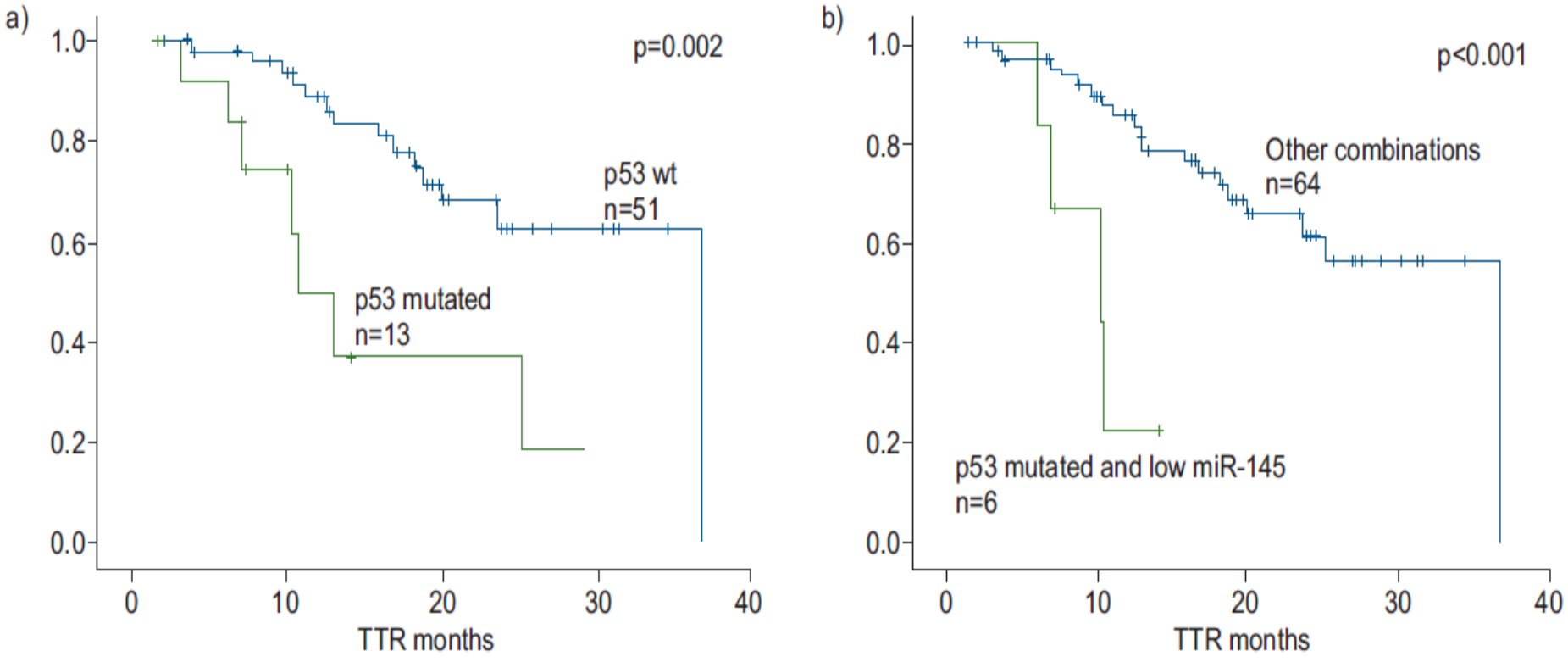


FIGURE 5. Kaplan–Meier curves for time to relapse (TTR) a) in patients with mutated or wild-type p53 and b) in patients with both mutated p53 and low miR-145 expression *versus* all other patients. wt: wild type.

Conclusions

- miR-145 y miR-367 podrien ser útils com factors pronòstics en el càncer de pulmó de cèl·lula no petita.

- p53 sembla relacionada amb l'expressió de miR-145 en el càncer de pulmó de cèl·lula no petita.

Eur Respir J 2013; 41: 1–1
DOI: 10.1183/09031936.00048712

Low miR-145 and high miR-367 are associated with unfavourable prognosis in resected nonsmall cell lung cancer

Marc Campayo*,f, Alfons Navarro#,f, Nuria Viñolas*, Tania Diaz#, Rut Tejero#, Josep M. Gimferrer¶, Laureano Molins¶, Maria L. Cabanas+, Jose Ramirez+, Mariano Monzo# and Ramon Marrades§

This work was supported by grants from FIS 080135, 09 00547, SEPAR and SOCAP.

bjh short report

Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma

Charles H. Lawrie,[1] Shira Gal,[1] Heather M. Dunlop,[1] Beena Pushkaran,[1] Amanda P. Liggins,[1] Karen Pulford,[1] Alison H. Banham,[1] Francesco Pezzella,[1] Jacqueline Boultwood,[1] James S. Wainscoat,[1] Christian S. R. Hatton[2] and Adrian L. Harris[3]

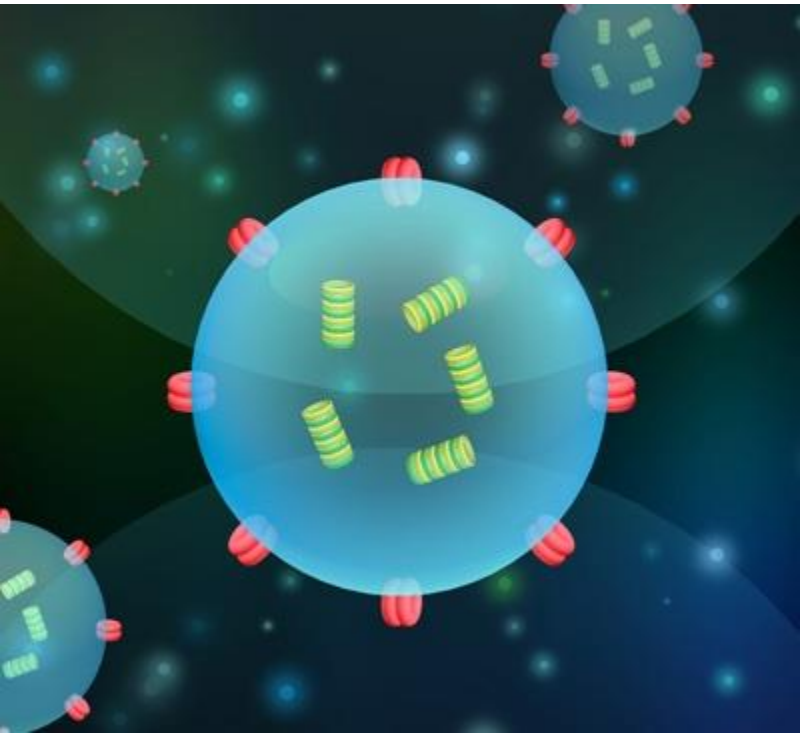
British Journal of Haematology, **141**, 672–675

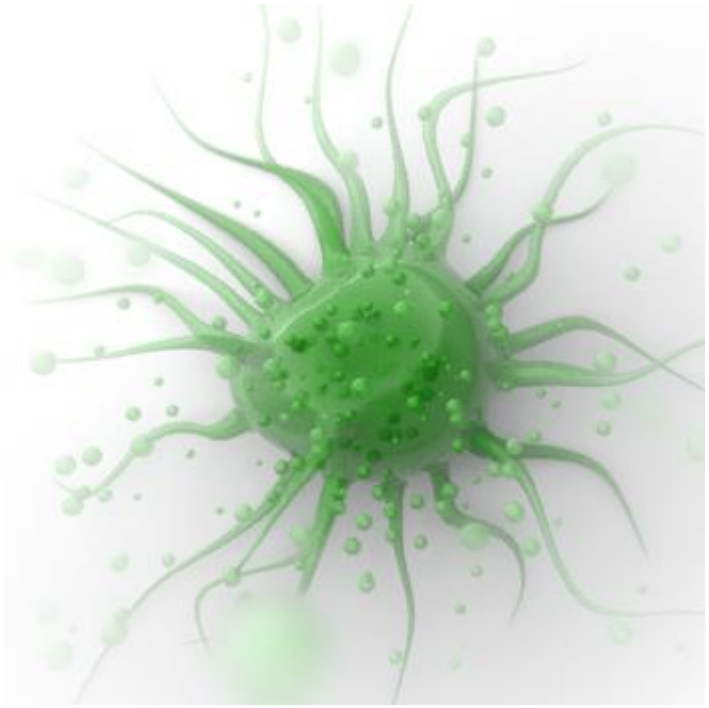
TABLE 2 Techniques used to profile microRNA (miRNA) expression

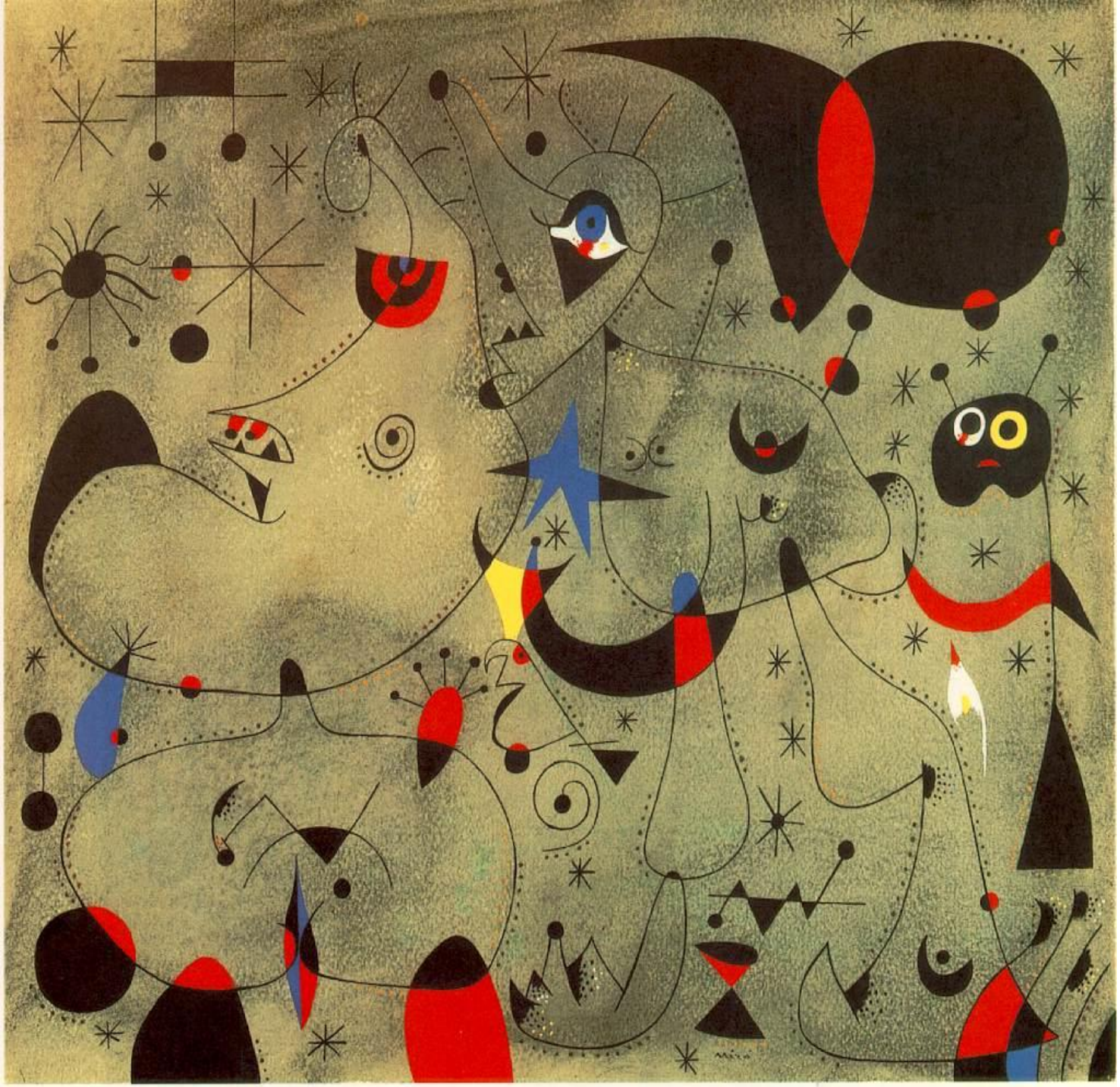
Technique	Details
Northern blotting	Uses radioactive probes
	Low sensitivity unless LNA-modified oligonucleoide probes used
	Very time-consuming and requires large amounts (5–25 μg) of total RNA from each sample
	Therefore, not practical in large clinical studies
Cloning	Identified many of the original miRNAs
	Time-consuming and impractical for large-scale detection of hundreds of miRNAs
miRNA oligo microarray	Involves hybridisation of miRNAs to oligonucleotides
	Allows for the detection of large numbers of miRNAs in one experiment
	Possible cross-detection of immature forms of miRNA
	Labour intensive, relatively expensive and a high level of expertise needed
	Requires large amounts of high-quality RNA to achieve reliable results
Bead-based flow cytometry	Involves both amplification and hybridisation
	Each latex bead is assigned to a unique miRNA
	For the PCR reaction biotinylated PCR forward primers are used, which can react enzymatically with streptavidin–phycoerythrin to emit a coloured signal that can be registered by a flow cytometer
	Can be used to indicate presence and quantity of specific miRNAs
	Extremely labour intensive
Real-time PCR/qPCR	Gold standard of nucleic acid quantification
	Able to detect low copy numbers with high sensitivity and specificity
	Can be used for clinical samples with minute amounts of available RNA
	Can discriminate between isoforms of related miRNAs that differ by only one or two base pairs
	qPCR-based microarrays can simultaneously determine expression levels for large numbers of miRNAs in a single experiment
***In situ* detection**	Can be used in paraffin-embedded, formalin-fixed tissue
	Can be used to locate the cellular and sub-cellular distribution of the miRNA
	Two methods: RT *in situ* PCR and *in situ* hybridisation with an LNA probe
Deep sequencing	Allows simultaneous sequencing of millions of RNA (or DNA) molecules
	Measures absolute abundance, allowing for the discovery of novel miRNAs
	Expensive but becoming more available to researchers

qPCR: quantitative PCR; LNA: locked nucleic acid; RT: reverse transcriptase.

Exosomes i microvesicules







Thanks
Merci
Gracias
Obrigado
Danke
Gràcies
Grazie
ありがとう
Multumesc
Gratia