

Papel del microARN *let-7* como
supresor tumoral en
cáncer de pulmón *in vivo*.

Real Academia de Medicina de la
Comunidad Valenciana

8 Mayo 2012

Pedro Medina

ARN EN LA REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS PROTEICA / FUNCIONES CELULARES

NATURE | VOL 391 | 19 FEBRUARY 1998

letters to nature

Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*

Andrew Fire^{*}, SiQun Xu^{*}, Mary K. Montgomery^{*},
Steven A. Kostas^{*†}, Samuel E. Driver[‡] & Craig C. Mello[‡]

- 1998, *Nature*: La inyección de ARN de doble cadena en el gusano *C. elegans* producía una inhibición potente y específica a la cadena de ARN inyectada.

- El descubrimiento se extendió a otros modelos animales: **la era del ARN de interferencia.**
- Aplicación Experimental: La inhibición específica de la expresión de genes permite realizar ensayos de pérdida de función (*knockdown*) en virtualmente todos los genes codificantes de proteína.

La revolución fue tan profunda que tan sólo 8 años después de la publicación de este artículo, se les concedió a los autores de este trabajo el premio Nobel de Medicina.



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006

Andrew Z. Fire, Craig C. Mello

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006

Nobel Prize Award Ceremony

Andrew Z. Fire

Craig C. Mello



Photo: L. Cicero

Andrew Z. Fire



Photo: J. Mottern

Craig C. Mello

dsRNA

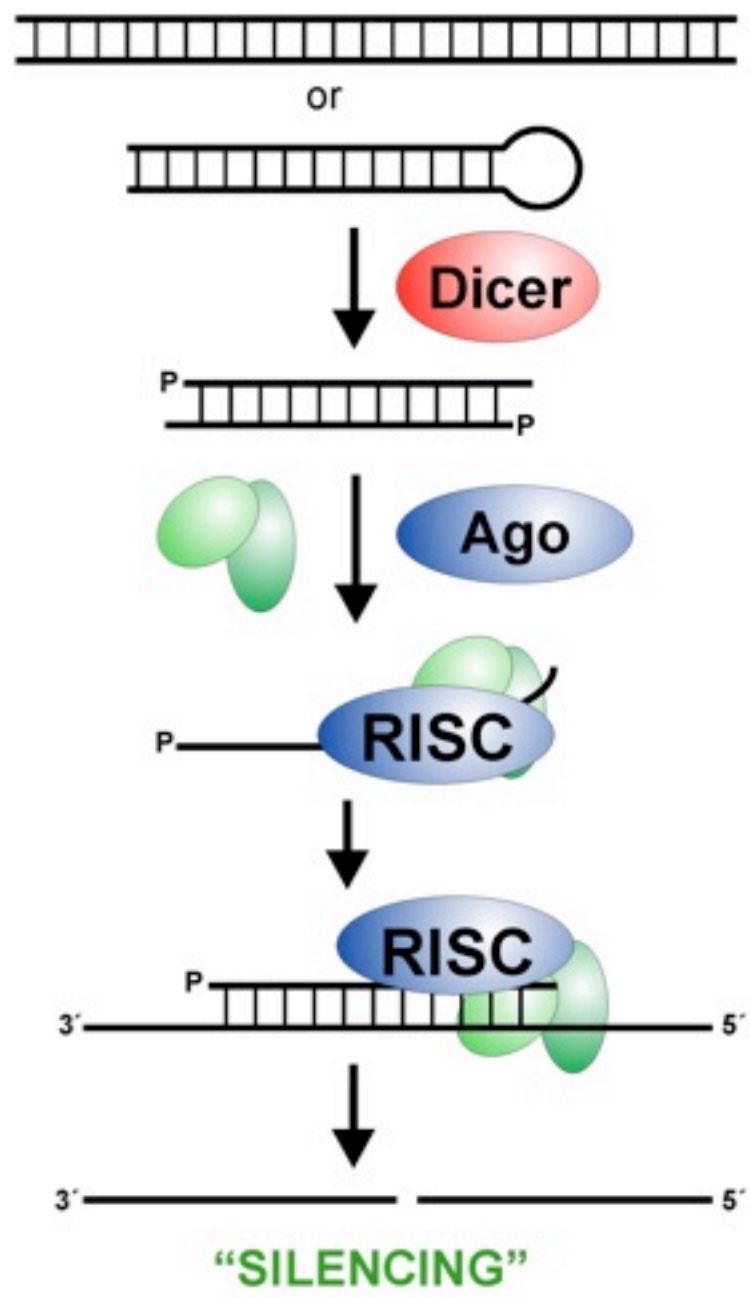
shRNA

siRNA duplex

Formation of RISC

RNA / mRNA-complex

sliced mRNA



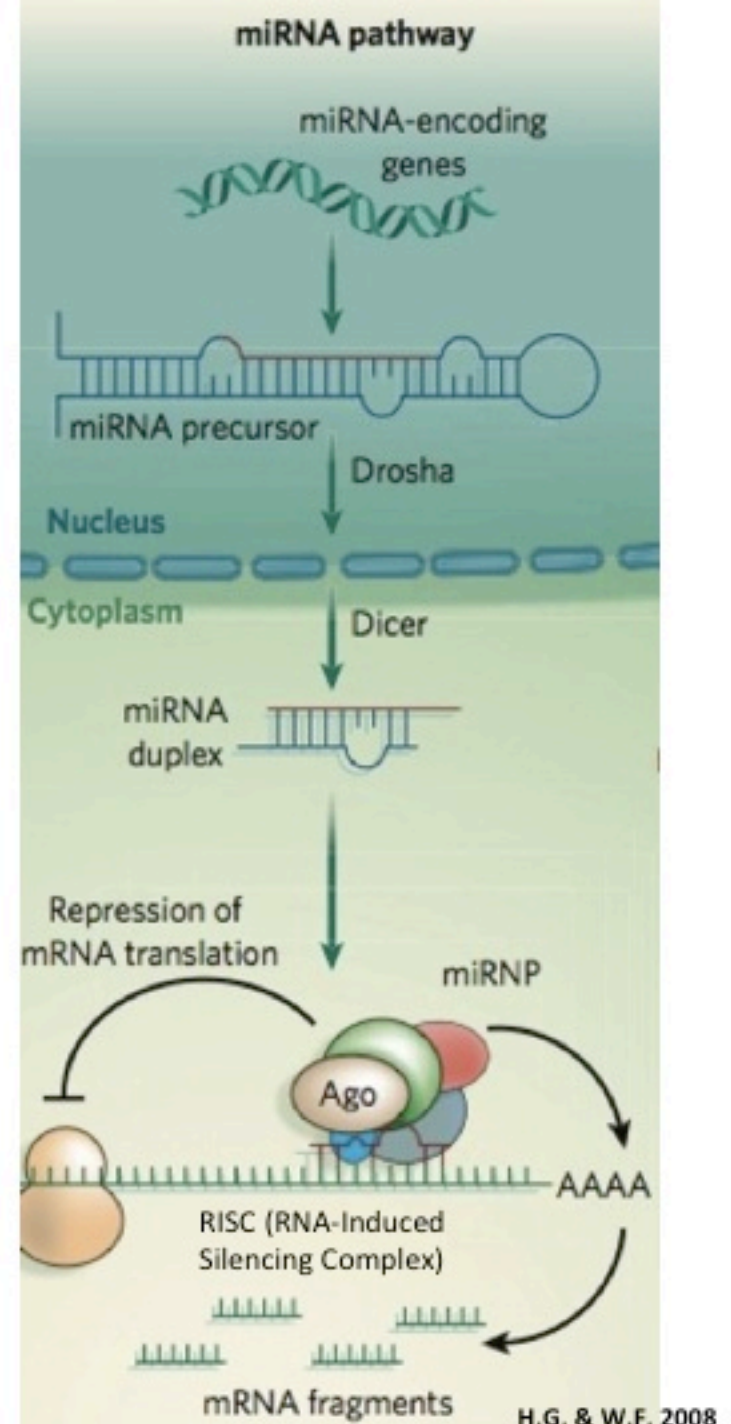
Maquinaria Celular responsable del ARN de interferencia (2000)

DICER: ARNasa III procesa los ARN de doble cadena produciendo ARN pequeños de interferencia (siARN).

Complejo de silenciamiento inducido por ARN (**RISC**, RNA-Induced Silencing Complex).

MicroRNAs (2001)


- ARN pequeños (18-20 nucleótidos).
- Endógenos (codificados por nuestros genes).
- Utilizan la maquinaria del ARN de interferencia (DICER y RISC).
- Actúan inhibiendo la traducción de la mayor parte de nuestros genes, uniéndose a la región del extremo 3' del ARN mensajero que los codifica.
- En nuestro genoma se han descubierto alrededor de mil de estos microARNs. Cada microARN puede controlar cientos de diferentes ARN mensajeros.



MicroARNs y Cáncer

- Componentes de la maquinaria celular que procesa los microARNs y los microARNs por sí mismos se han encontrado implicados en procesos que afectan a diversas patologías (entre las que se incluye el cáncer): como proliferación, diferenciación y apoptosis, etc.
- MicroARNs se han encontrado mutados o con expresión aberrante en cáncer.
- Algunos microARNs (oncomiRs) son capaces de regular genes que presentan un papel fundamental en el desarrollo del cáncer.

Representative miRNA involved in cancer, proposed role (TS, tumor suppressor; OG, oncogen) and representative targets tested experimentally

miRNAs	Role	Representative targets tested experimentally
miR-15a miR-16-1	TS	BCL2
let-7 family 	TS	RAS family, HGMA2, MYC, CDK6, CDC25
miR-34 family	TS	E2F3, CDK4, CDK6, CCNE2, BIR3, DCR3, BCL2
miR-17-92-1 cluster	OG	E2F family
miR-21	OG	PTEN, TPM1, PDCD4
miR-155	OG	TP53INP1
miR-372 miR-373	OG	LAST2

La familia de microARNs *let-7*

- *Lethal-7 (let-7)* fue descrito en *C. elegans* por primera vez.
- Fue el primer microARN descubierto en humanos.
- En humanos la familia de microARNs está compuesta por 12 genes, que codifican 9 microARNs maduros.

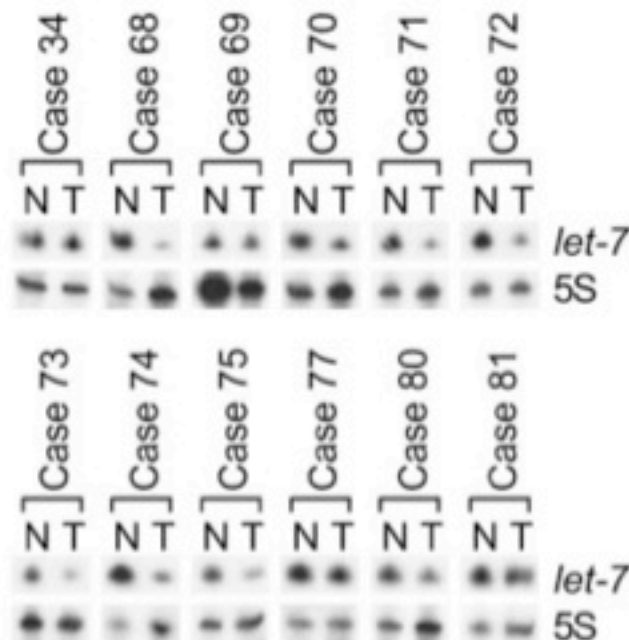
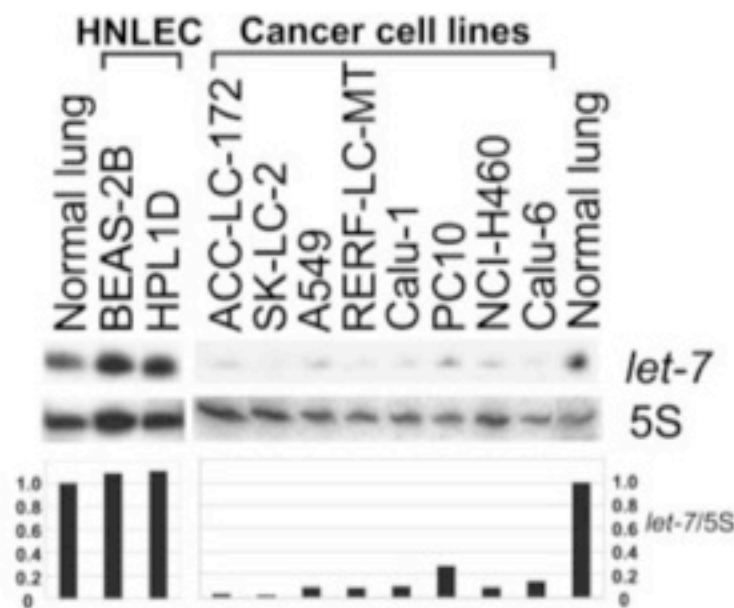
Gene	Genome position	Mature sequence
hsa-let-7a-1	09:95978060-95978139	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT
hsa-let-7a-2	11:121522440-121522511	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT
hsa-let-7a-3	22:44887293-44887366	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT
hsa-let-7b	22:44888230-44888312	TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTT
hsa-let-7c	21:16834019-16834102	TGAGGTAGTAGGTTGTATGGTT
hsa-let-7d	09:95980937-95981023	AGAGGTAGTAGGTTGCATAGT
hsa-let-7e	19:56887851-56887929	TGAGGTAGGAGGTTGTATAGT
hsa-let-7f-1	09:95978450-95978536	TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT
hsa-let-7f-2	0X:53600878-53600960	TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT
hsa-let-7g	03:52277334-52277417	TGAGGTAGTAGTTTGTACAGT
hsa-let-7i	12:61283733-61283816	TGAGGTAGTAGTTTGTGCTGT
hsa-mir-98	0X:53599909-53600027	TGAGGTAGTAGTTGTATTGTT
family seed		*GAGGTAG*****

Evidencias de su función como supresor tumoral en cáncer de pulmón I:

let-7 pierde su expresión en el proceso carcinogénico.

LC (No CP) LC Cáncer Pulmón

Tumores primarios

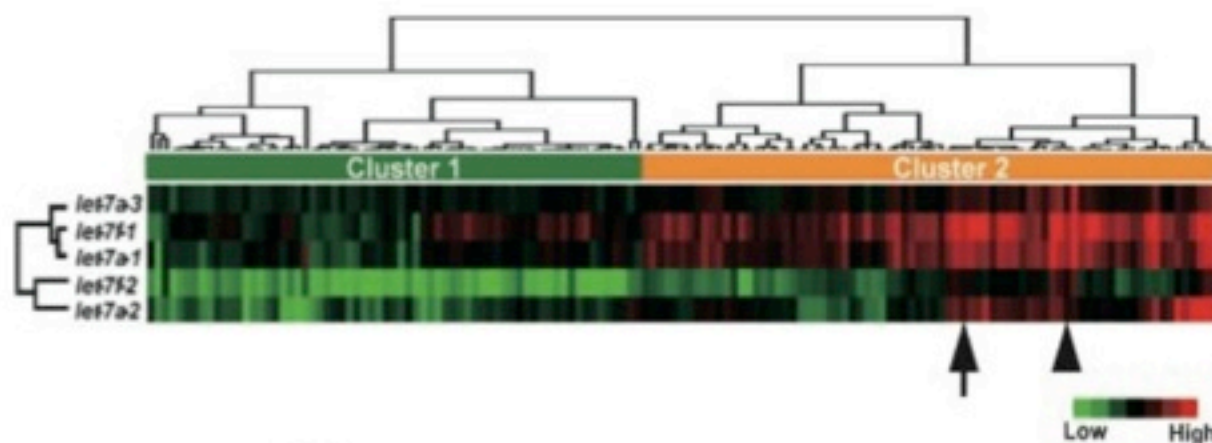


Northern Blot analysis
N: normal
T: tumoral.

El 44% de las muestras perdían más de un 80% de la expresión de *let-7*

Evidencias de su función como supresor tumoral en cáncer de pulmón II:

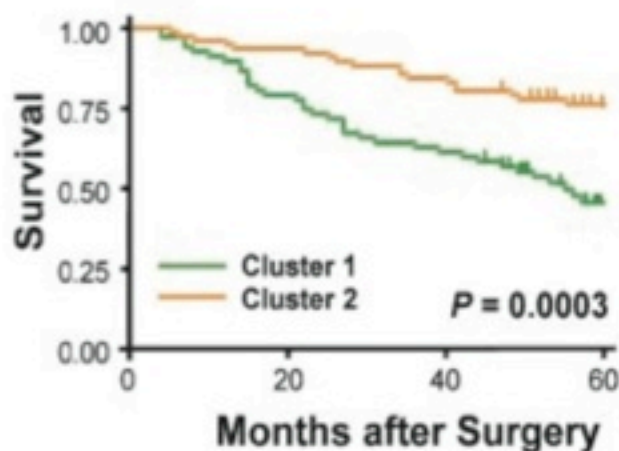
El pronóstico de los pacientes está directamente correlacionado con los niveles de expresión de *let-7*.



146 patients

Cluster 1: low *let-7* levels

Cluster 2: high *let-7* levels



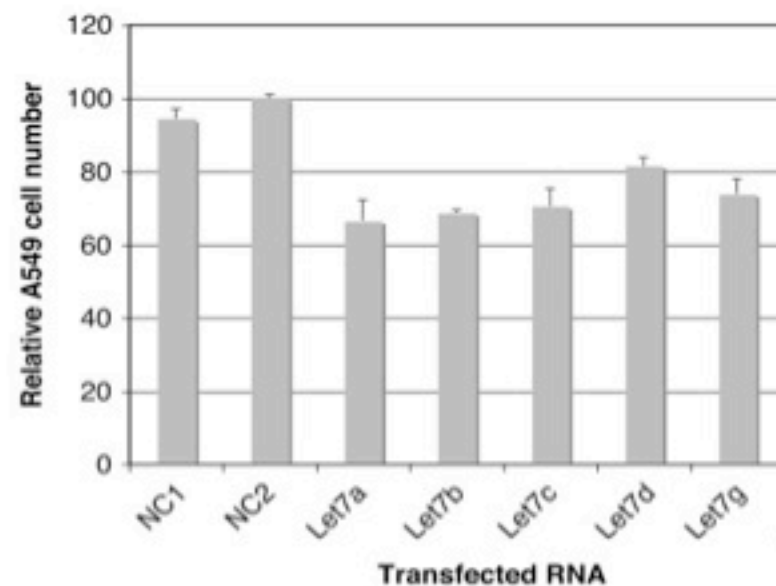
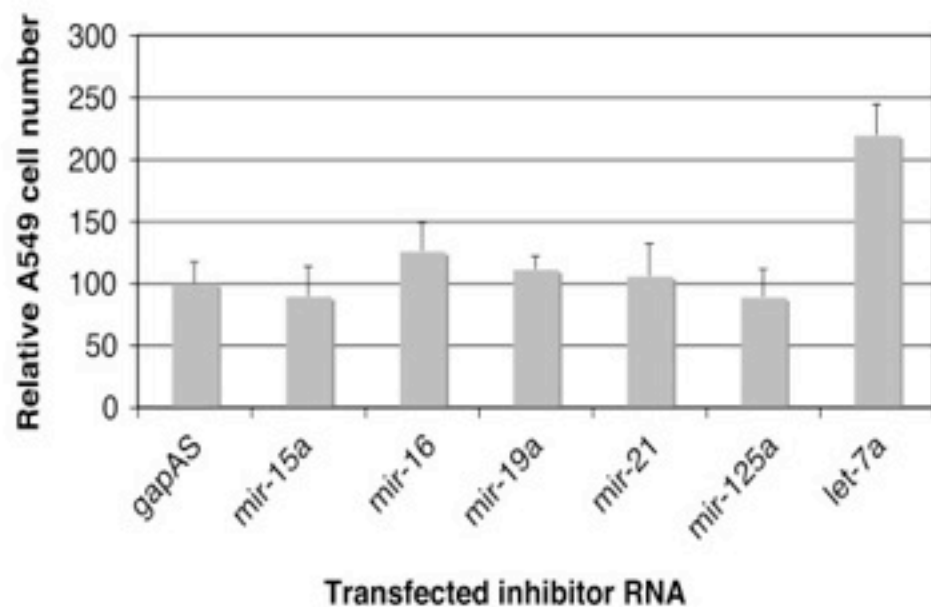
Existe un pronóstico significativamente peor para pacientes con niveles reducidos de *let-7*.

Evidencias de su función como supresor tumoral en cáncer de pulmón II:

La inhibición de *let-7* promueve la división de las líneas celulares de cáncer de pulmón, y la expresión de *let-7* inhibe su proliferación.

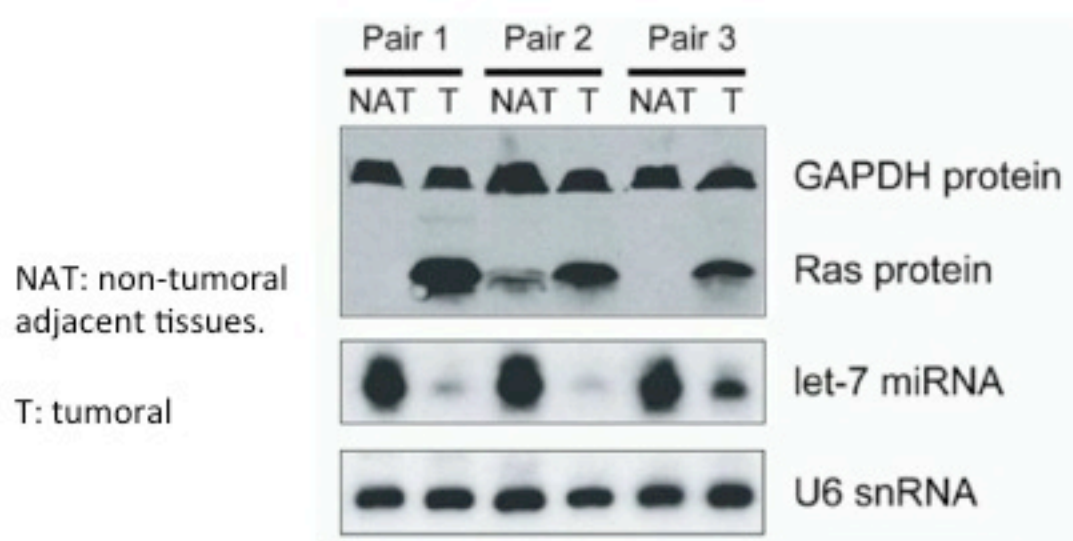
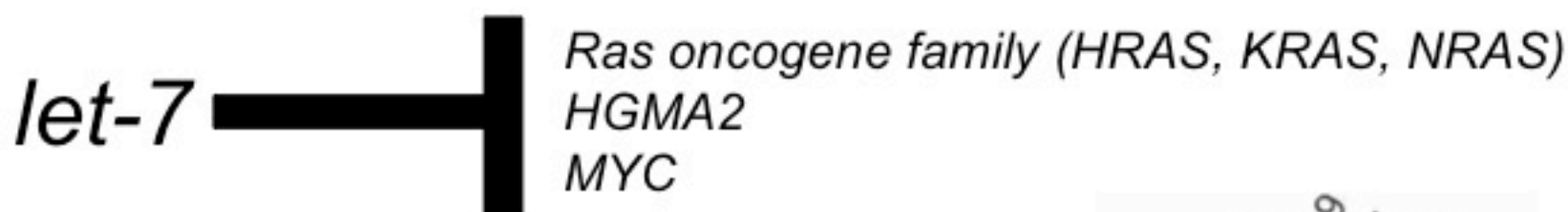
* Inhibition of *let-7* promotes proliferation

* Transfection of *let-7* inhibits proliferation



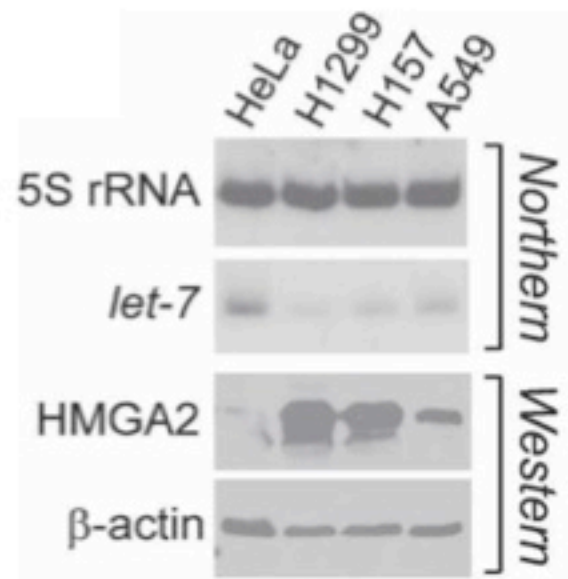
Evidencias de su función como supresor tumoral en cáncer de pulmón III:

let-7 regula negativamente la expresión de oncogenes importantes:



Reciprocal expression *let-7* and Ras

Johnson SM. et al 2005



Reciprocal expression *let-7* and HMGA2

Mayr C et al 2007

¿Funciona *let-7* como un gen supresor tumoral *in vivo*?

Valor terapéutico de la reintroducción de *let-7*:

- Modelo de Xenotransplante de cáncer de pulmón.
(*synthetic let-7*).
- Modelo de cáncer de pulmón inducido por KRAS G12D
(*lentivirus let-7*).

Repercusiones de la inhibición de la actividad de *let-7*:

- Modelo de cáncer de pulmón inducido por KRAS G12D
(*antimiRs*).

¿Funciona *let-7* como un gen supresor tumoral *in vivo*?

Valor terapéutico de la reintroducción de *let-7*:

- Modelo de Xenotransplante de cáncer de pulmón. (*synthetic let-7*).
- Modelo de cáncer de pulmón inducido por KRAS G12D (*lentivirus let-7*).

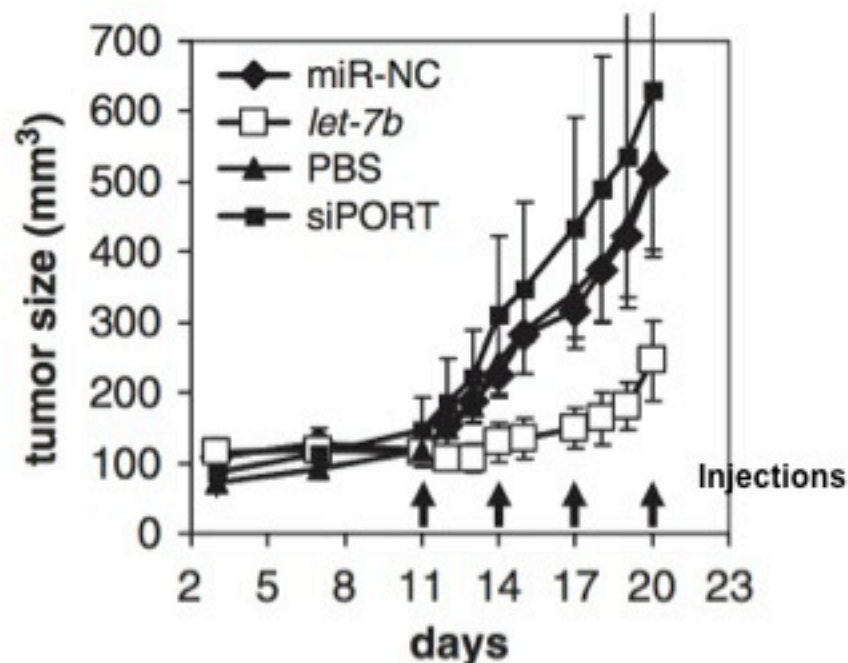
Repercusiones de la inhibición de la actividad de *let-7*:

- Modelo de cáncer de pulmón inducido por KRAS G12D (*antimiRs*).

Inhibición del crecimiento de tumores xenotransplantados de cáncer de pulmón mediante la introducción de oligonucleótidos *let-7*

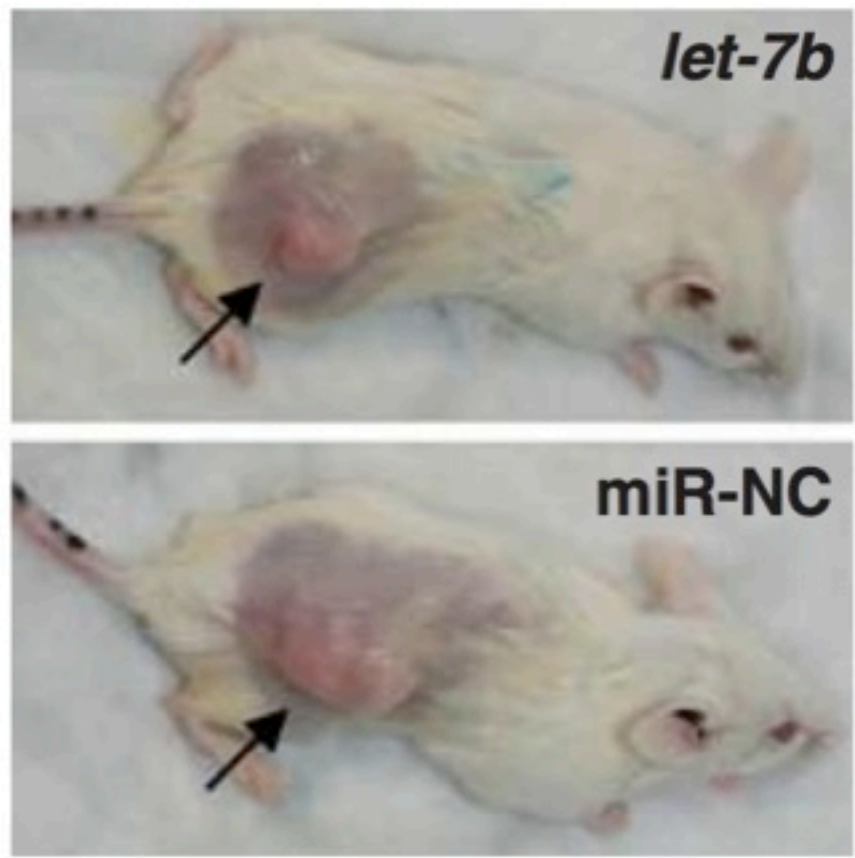
Lung cancer (H460) xenografts

20 days Xenograft

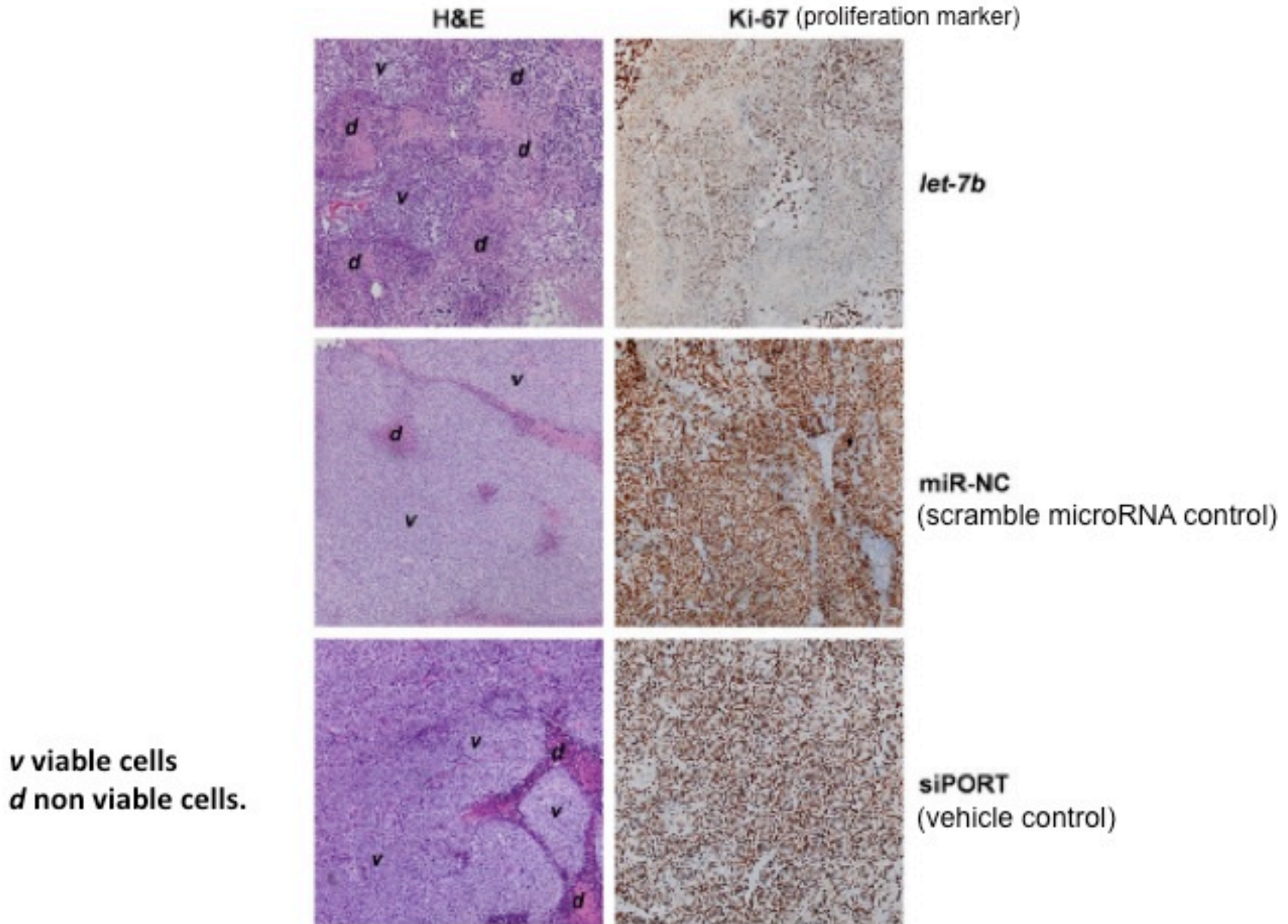


Controls:

- miR-NC: microRNA scramble
- siPORT: vehicle (transfect agent)
- PBS: empty

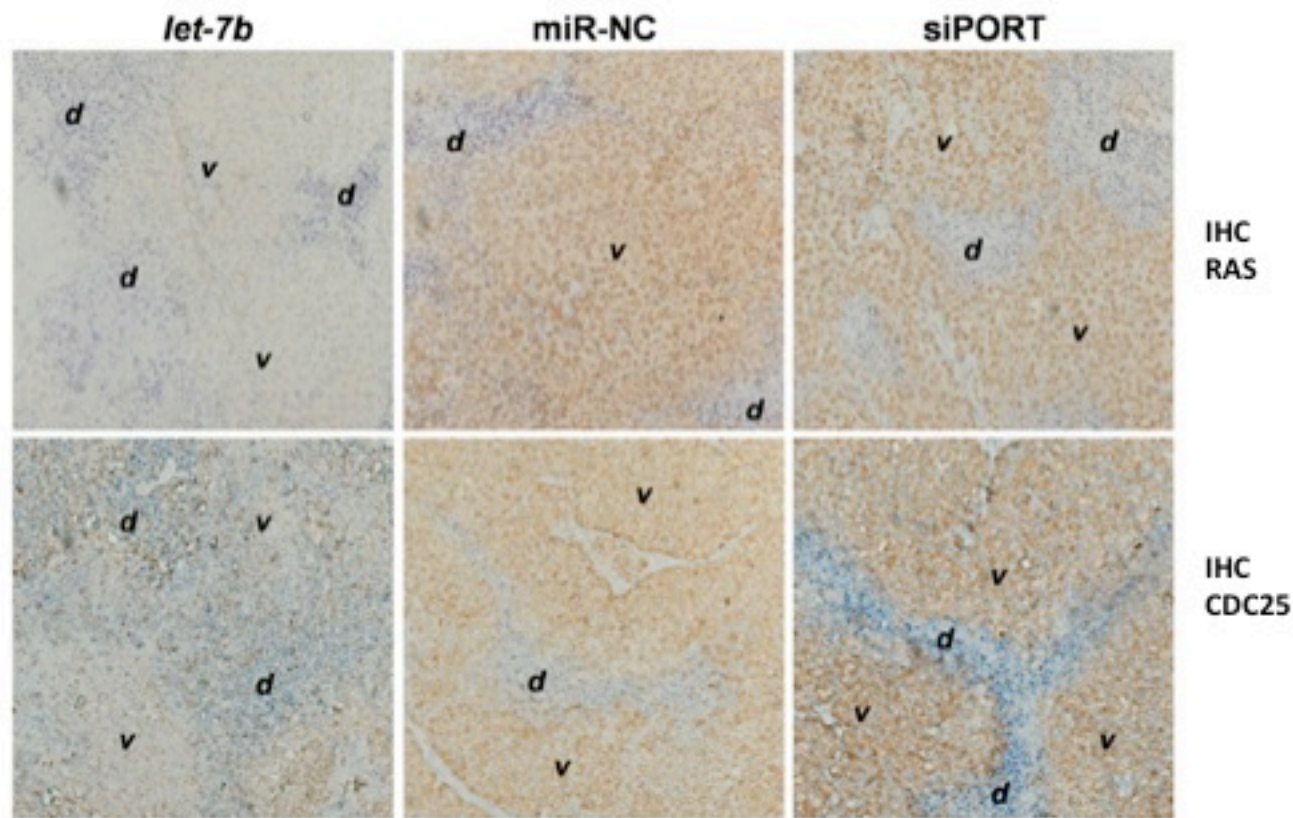
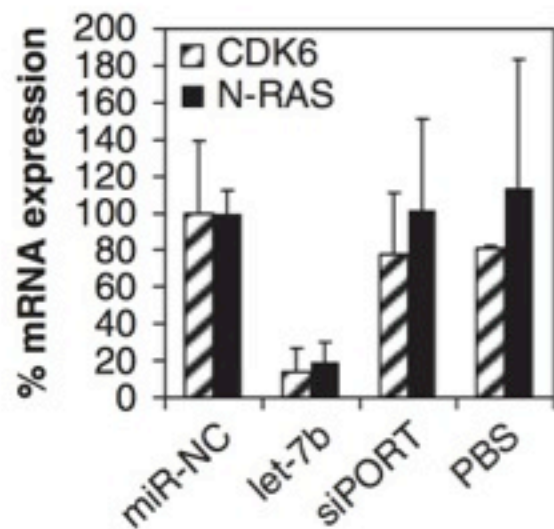


La administración de *let-7* en xénografts H460 reduce la proliferación y viabilidad celular.



let-7 inhibe la expresión de RAS, CDK6 and CDC25

Let-7 introduction reduce the mRNA of CDK6 and N-RAS



v viable cells
d non viable cells.

Conclusiones

- La administración de *let-7* en xénografts H460 reduce la proliferación y viabilidad celular.
- *let-7* inhibe la expresión de RAS, CDK6 and CDC25

¿Funciona *let-7* como un gen supresor tumoral *in vivo*?

Valor terapéutico de la reintroducción de *let-7*:

- Modelo de Xenotransplante de cáncer de pulmón.
(*synthetic let-7*).
- Modelo de cáncer de pulmón inducido por KRAS G12D
(*lentivirus let-7*).

Repercusiones de la inhibición de la actividad de *let-7*:

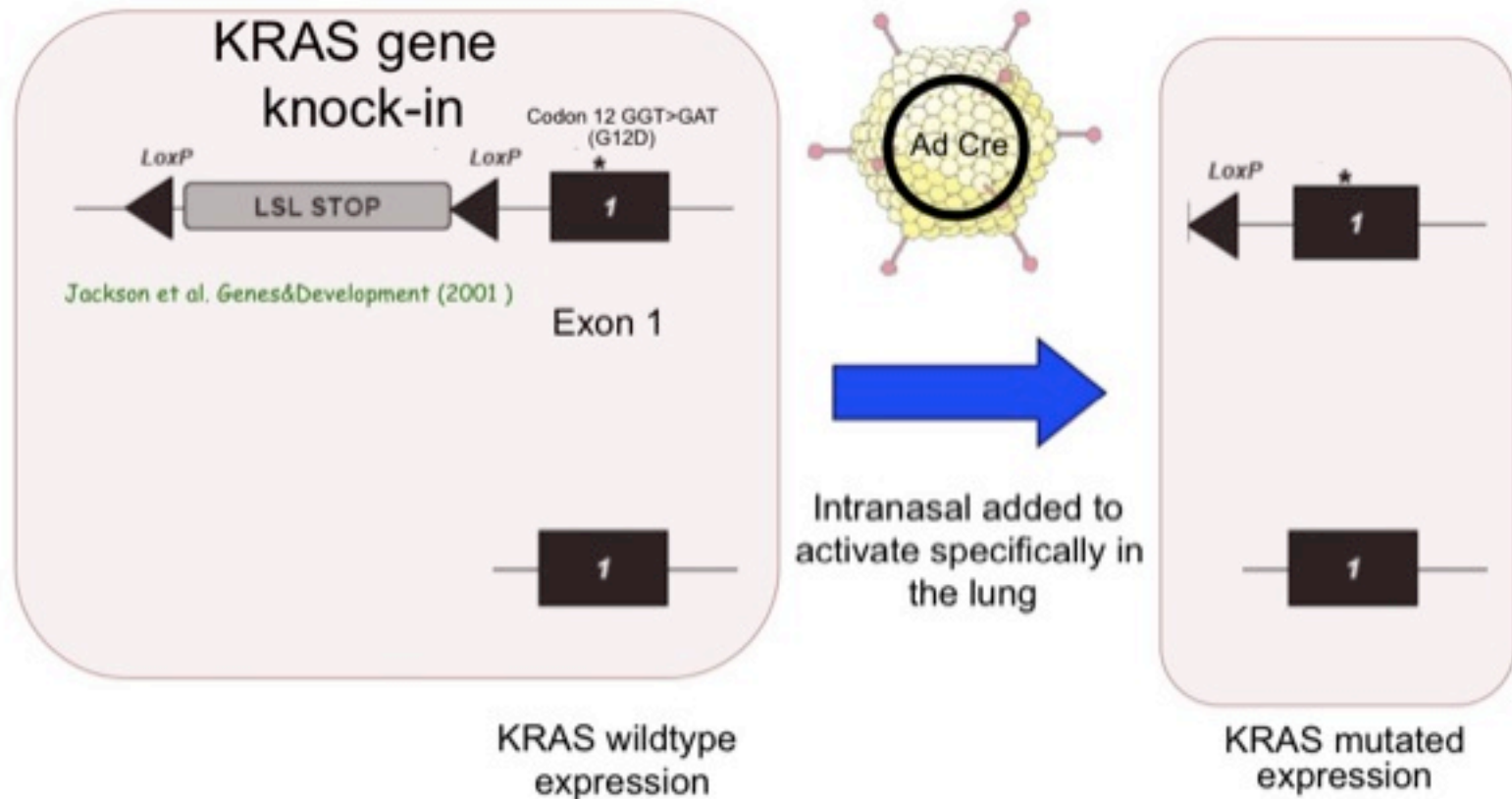
- Modelo de cáncer de pulmón inducido por KRAS G12D
(*antimiRs*).

let-7 inhibe la expresión de la familia *RAS* (Johnson et al 2005).

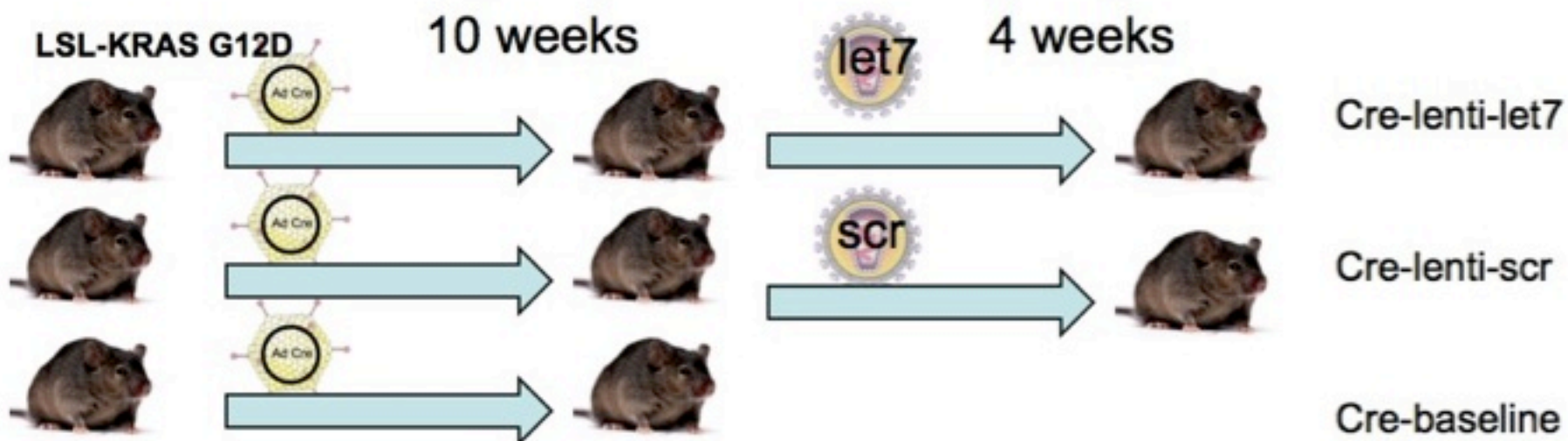
B6;129-Kras2^{tm4Tyj}

LSL-KRAS G12D lung cancer mouse model

Strain Code: **01XJ6**



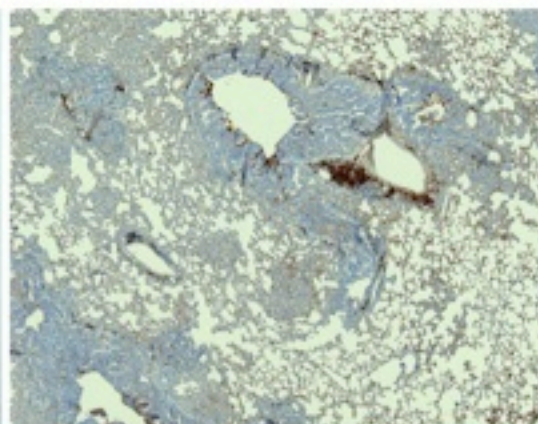
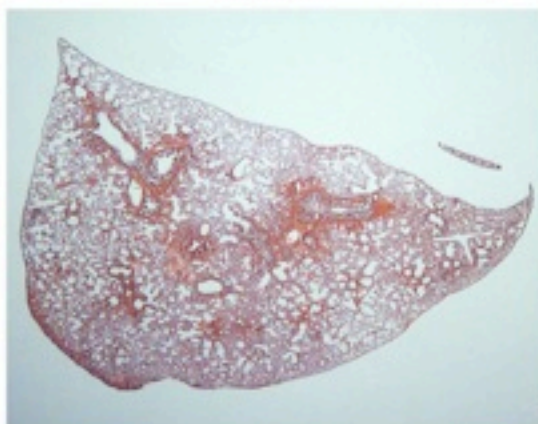
Efecto terapéutico de la expresión ectópica de *let-7* en el modelo de cáncer de pulmón inducido por *KRAS G12D*



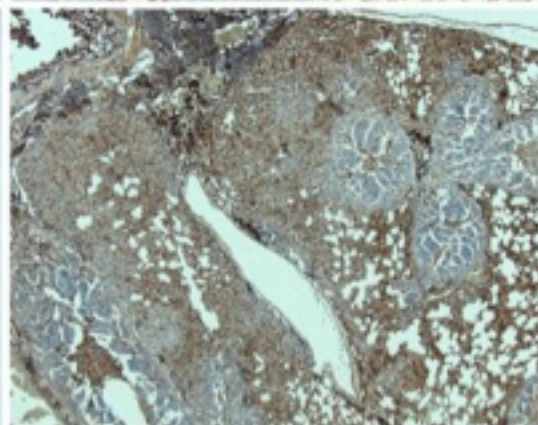
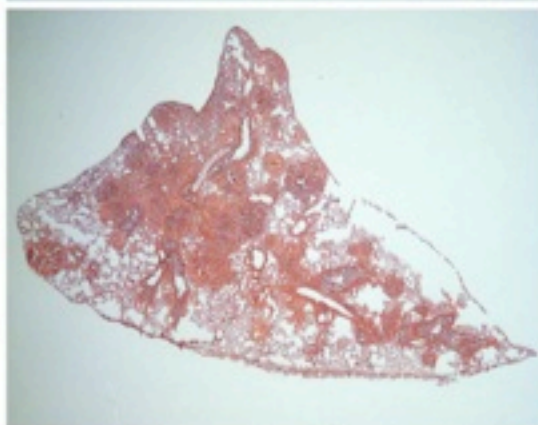
El tratamiento con *let-7* reduce la proliferación celular y la carga tumoral

H&E

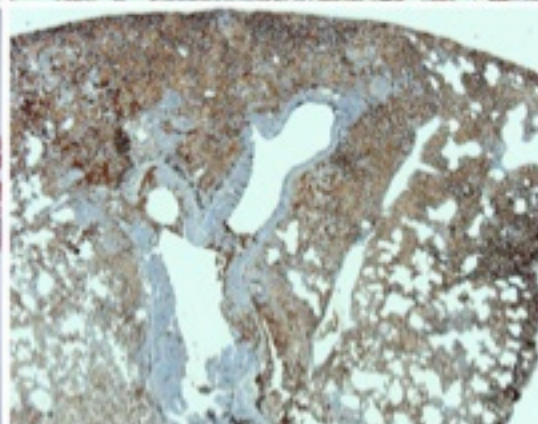
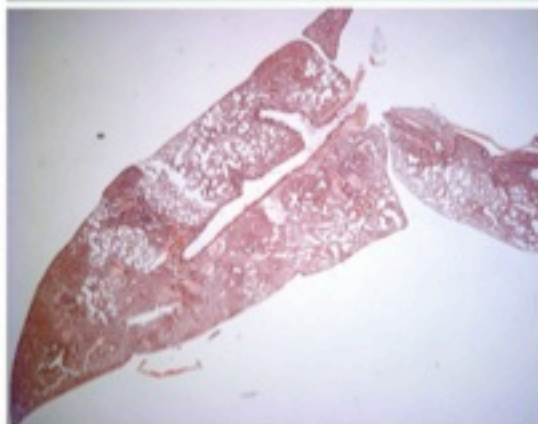
Ki-67 Cell proliferation



Cre/lenti-*let-7*

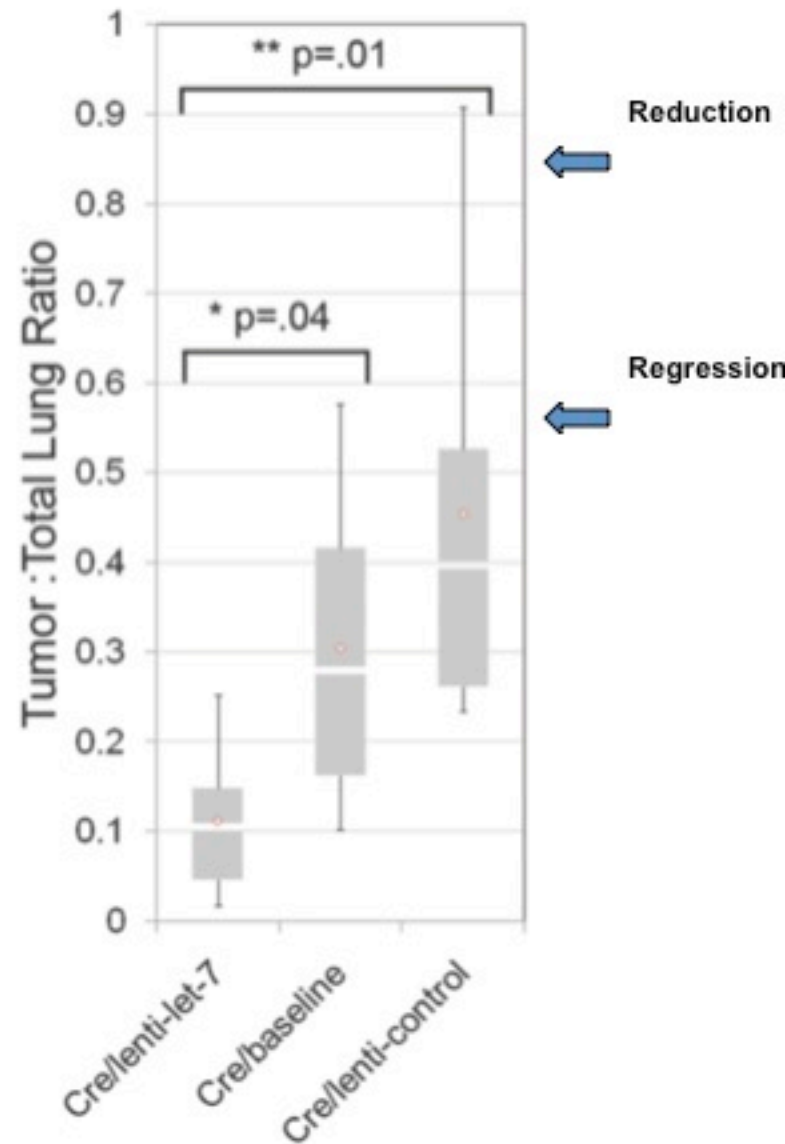
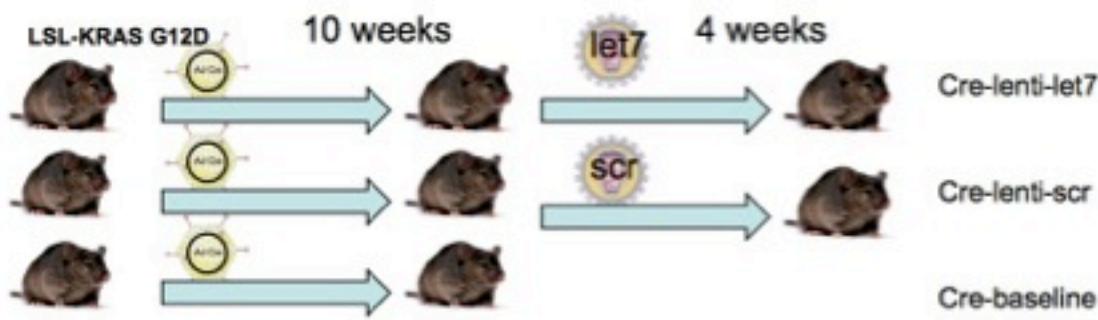


Cre/lenti-control



Cre-baseline

La expresión ectópica de *let-7* reduce la proliferación celular y la carga tumoral



¿Funciona *let-7* como un gen supresor tumoral *in vivo*?

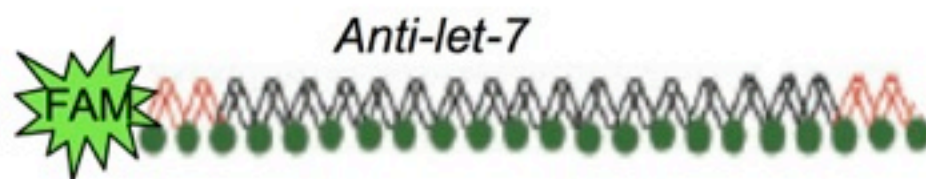
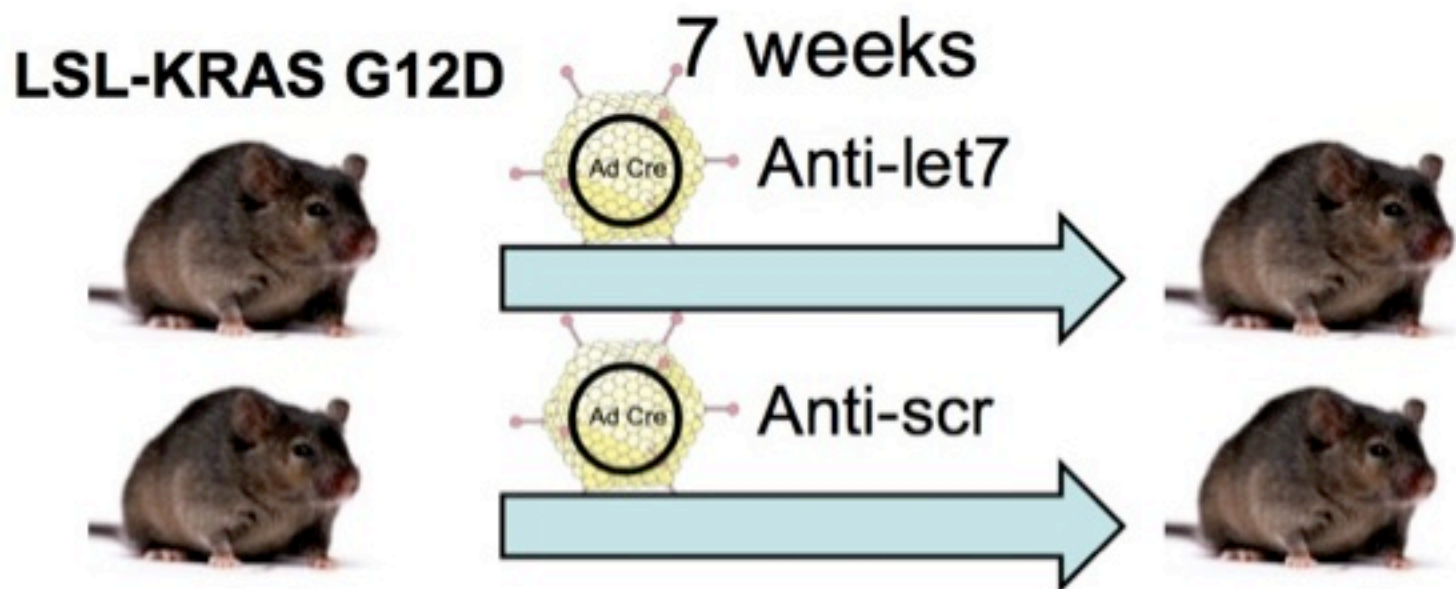
Valor terapéutico de la reintroducción de *let-7*:

- Modelo de Xenotransplante de cáncer de pulmón. (*synthetic let-7*).
- Modelo de cáncer de pulmón inducido por KRAS G12D (*lentivirus let-7*).

Repercusiones de la inhibición de la actividad de *let-7*:

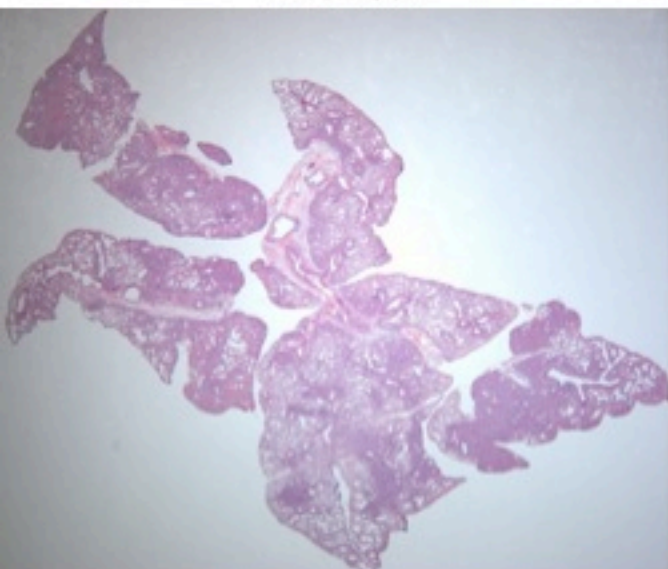
- Modelo de cáncer de pulmón inducido por KRAS G12D (*antimiRs*).

Inhibición de *let-7* mediante antimRs en el modelo de cáncer de pulmón *KRAS G12D*

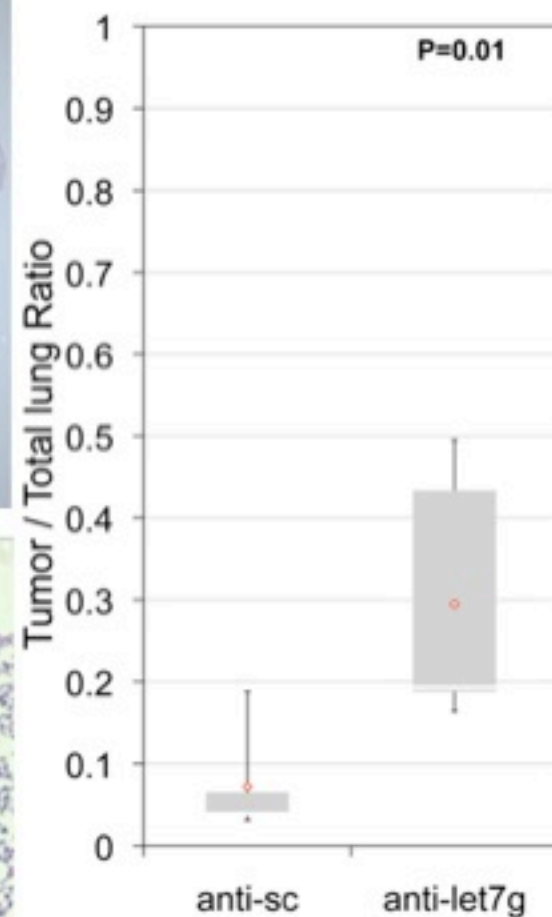
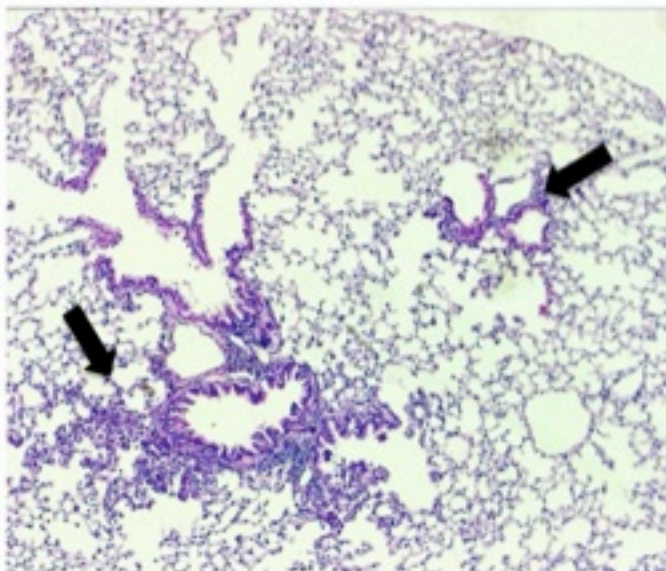
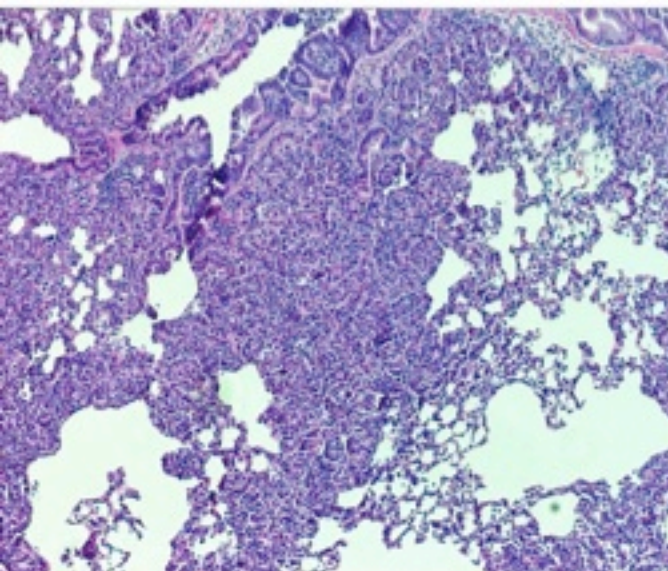
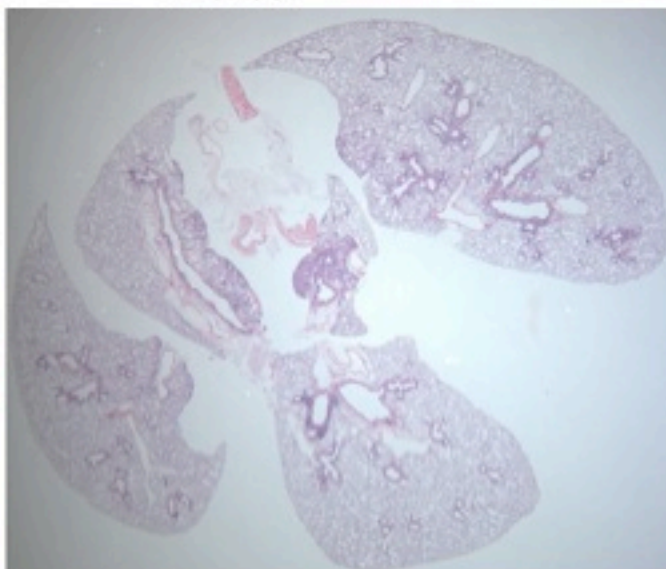


Anti-*let-7* incrementa la carga tumoral en el modelo de cancer de pulmón *KRAS G12D*

Anti-let-7



Anti-scr



Conclusiones

- La expresión ectópica de *let-7* reduce la proliferación celular y la carga tumoral en el modelo animal de cáncer de pulmón *KRAS G12D*.

- Anti-*let-7* aumenta la formación tumoral en el modelo animal de cáncer de pulmón *KRAS G12D*.

***let-7* es un supresor tumoral *in vivo* y la reintroducción de su actividad puede tener un valor terapéutico.**