

A dieta di RNA: microRNA di piante regolano la proliferazione di cellule tumorali umane

Flaviana Marzano^{1,2}, Mariano Francesco Caratozzolo¹, Arianna Consiglio¹, Daniela Isabel Abbrescia¹, Sabino Liuni¹, Flavio Licciulli¹, Domenica D'Elia¹, Apollonia Tullo², Domenico Catalano¹, Elisabetta Sbisà¹

¹Istituto di Tecnologie Biomediche, CNR Bari

²Istituto di Biomembrane, Bioenergetica e Biotecnologie Molecolari, CNR Bari

Alla luce delle recenti scoperte scientifiche e studi epidemiologici, è ormai evidente che l'alimentazione influenza il nostro stato di salute. È stato dimostrato che una dieta sana ed equilibrata, caratterizzata da un'abbondanza di fibre, frutta, verdura, legumi, pesce e da una riduzione di carni rosse, grassi e zuccheri, aiuta a ridurre il rischio di numerose patologie croniche quali malattie cardiovascolari, neurodegenerative, diabete e cancro.

Lavori pubblicati di recente dimostrano che l'alimentazione è in grado di modulare l'espressione di microRNA (miRNA) umani [1]. I miRNA, piccole molecole di RNA di 20-22 nucleotidi (nt), agiscono come regolatori negativi dell'espressione genica, tramite l'appaiamento di una piccola sequenza conservata di 6 nt della loro regione 5' (seed) con una sequenza complementare localizzata nella regione 3'UTR degli RNA messaggeri (mRNA) (target) negli animali, e per tutta la loro lunghezza nelle piante.

Sebbene in letteratura siano riportati lavori discordanti sulla capacità di alcuni miRNA vegetali di accumularsi nei sieri e nei tessuti animali, numerose evidenze sperimentali dimostrano che miRNA derivanti da piante edibili, assimilati principalmente per via orale attraverso l'alimentazione, sono in grado di superare la barriera gastrointestinale e accumularsi nei tessuti e fluidi dell'uomo e di organismi modello [2-5; 6 per Review].

Sulla base di questi dati, abbiamo condotto uno studio pilota, utilizzando un approccio sia bioinformatico (vedi abstract Licciulli et al) che sperimentale, per indagare se i miRNA di piante edibili potessero regolare l'espressione di geni umani, mimando l'azione dei microRNA endogeni.

Pertanto il primo step è stato quello di verificare se i miRNA di piante edibili avessero la regione seed uguale a quella di miRNA umani. Sono stati analizzati 4.803 miRNA di piante di cui 2855 hanno mostrato nella regione al 5' una sequenza identica a quella di seed di miRNA umani, ma nessuno di essi con sequenza perfettamente identica a un miRNA umano per tutta la sua lunghezza.

La scelta dei miRNA di piante da utilizzare nella successiva fase sperimentale, è stata fatta in seguito ad un'analisi funzionale di potenziali geni target di miRNA umani correlati alla proliferazione cellulare, all'insorgenza e progressione del cancro e con seed identico a quelli vegetali analizzati. I geni target sono stati estratti dalla banca dati miRTarBase che contiene dati di validazione sperimentale dell'interazione dei miRNA con i geni umani [7, 8].

Sono stati così selezionati 7 miRNA vegetali con seed identico (e quindi potenziali omologhi funzionali) a 35 miRNA umani con dimostrata capacità di regolare geni coinvolti nel ciclo cellulare, nella progressione tumorale e nella formazione delle metastasi.

I miRNA vegetali selezionati sono stati trasfettati in mix in due linee cellulari umane di cancro al colon che si differenziano per la presenza o l'assenza dell'oncosoppressore p53 (HCT116-p53+/+ e HCT116-p53/-). A 24, 48 e 72h dalla trasfezione sono stati eseguiti esperimenti di proliferazione cellulare mediante saggio MTT. 72h ore dopo la trasfezione è stata osservata una riduzione della proliferazione cellulare pari al 30% nelle cellule HCT116 p53/- e del 20% nelle HCT116 p53+/. Sulla base dei risultati positivi dell'MTT è stato estratto l'RNA totale, dalle stesse linee cellulari umane, per studiare l'effetto dei miRNA di piante sull'intero profilo trascrittomico (coding and non-coding RNAs) con tecnologia di Next Generation Sequencing, utilizzando la piattaforma Illumina MiSeq.

L'analisi del profilo di espressione ha mostrato che circa 300 geni codificanti proteine sono differenzialmente espressi nelle HCT116 p53+/+ e circa 90 geni nelle HCT116 p53-/-, suggerendo così un effetto di regolazione diretto o indiretto su geni umani da parte dei miRNA vegetali trasfettati.

Il profilo di espressione ha anche mostrato che, nelle cellule HCT116-p53+/+ e nelle HCT116 p53-/-, appaiono differenzialmente espressi rispettivamente 14 e 10 long non coding RNA (lncRNA) e tra questi MALAT1 (Metastasis-Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1) and NEAT1 (nuclear paraspeckle assembly transcript 1) risultavano maggiormente downregolati con una elevata significatività statistica. I lncRNA svolgono ruoli chiave nella regolazione dell'espressione genica in molteplici condizioni fisiologiche e la loro deregolazione è associata a diverse condizioni patologiche. In particolare, numerose evidenze sperimentali indicano che, in diversi tipi di tumore, l'overespressione di MALAT1 e NEAT1 è strettamente correlata alla progressione tumorale e i due lncRNA sono considerati biomarcatori dello sviluppo di metastasi e di prognosi infausta [9, 10].

Analizzando il seed dei miRNA vegetali trasfettati è stato trovato che due miRNA, il mtr-miR5754 ed il gma-miR4995, possiedono un seed complementare a regioni nella 3' UTR rispettivamente di MALAT1 e NEAT1. Queste regioni sono state clonate in un vettore reporter, a valle del gene della luciferasi, per verificare che ci fosse un'interazione diretta tra questi miRNA vegetali e MALAT1 e NEAT1. Saggi reporter ed esperimenti di RT-qPCR hanno confermato i dati di trascrittomici e che i miRNA vegetali agiscono su MALAT1 e NEAT1 riducendone la loro espressione.

I risultati di questo studio aprono nuovi importanti scenari sulla capacità di alcuni alimenti di migliorare lo stato di salute dell'uomo spiegando i possibili meccanismi molecolari che potrebbero essere alla base degli effetti benefici di una dieta ricca di vegetali su importanti processi cellulari. Questi risultati possono offrire la possibilità dell'uso di miRNA vegetali nella prevenzione dei tumori e di altre condizioni patologiche, come le malattie infiammatorie croniche, e di processi fisiologici come l'invecchiamento.

Referenze

1. García-Segura L, Pérez-Andrade M, Miranda-Ríos J. The emerging role of MicroRNAs in the regulation of gene expression by nutrients. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2013;6:16-31. doi: 10.1159/000345826.
2. Zhang L, Hou D, Chen X, Li D, Zhu L, Zhang Y et al. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Research*. 2012;22:107-126. doi:10.1038/cr.2011.158
3. Mlotshwa S, Pruss GJ, MacArthur JL, Endres MW, Davis C, Hofseth LJ, Peña MM, Vance V. A novel chemopreventive strategy based on therapeutic microRNAs produced in plants. *Cell Res*. 2015; 25:521-524.
4. Snow JW, Hale AE, Isaacs SK, Baggish AL, Chan SY. Ineffective delivery of diet-derived microRNAs to recipient animal organisms. *RNA Biol*. 2013;10:1107-1116.
5. Liang G, Zhu Y, Sun B, Shao Y, Jing A, Wang J, Xiao Z., Assessing the survival of exogenous plant microRNA in mice. *Food Sci Nutr*. 2014;2:380-388. doi: 10.1002/fsn3.113. Epub 2014 May 15.
6. Zhao Q, Liu Y1, Zhang N, Hu M, Zhang H, Joshi T, Xu D. Evidence for plant-derived xenomiRs based on a large-scale analysis of public small RNA sequencing data from human samples. *PLoS One*. 2018;13:e0187519. doi: 10.1371/journal.pone.0187519. eCollection 2018
7. Hsu SD, Tseng YT, Shrestha S, Lin YL, Khaleel A, Chou CH, et al. miRTarBase update 2014: an information resource for experimentally validated miRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res*. 2014;42:D78-85. doi: 10.1093/nar/gkt1266.
8. Chou CH, Shrestha S, Yang CD, Chang NW, Lin YL, Liao KW, et al. miRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1):D296-D302. doi: 10.1093/nar/gkx1067.
9. Adriaens C, Marine JC. NEAT1-containing paraspeckles: Central hubs in stress response and tumor formation. *Cell Cycle*. 2017;16:137-138. doi: 10.1080/15384101.2016.1235847. Epub 2016 Oct 4.

10. Zhang X, Hamblin MH, Yin KJ. (2017) The long noncoding RNA Malat1: Its physiological and pathophysiological functions. *RNA Biol.* Dec 2;14(12):1705-1714. doi:10.1080/15476286.2017.1358347