
FONDAZIONE
Buzzi Unicem

ONLUS



Revisione Bibliografica Secondo semestre 2015

Dicembre 2014

Elisa Roca (elisaroca@gmail.com)

Micro-RNAs e Mesotelioma Pleurico Maligno

Introduzione

Il mesotelioma pleurico maligno (MPM) è una neoplasia legata all'esposizione all'asbesto (1, 2) che resta una patologia tumorale aggressiva con una prognosi infausta e un trattamento standard che non ha migliorato di molto la sopravvivenza (3-9). Per questo motivo, numerose ricerche si spingono in questo ambito per cercare di apportare nuove evidenze che possano contribuire ad una miglior conoscenza di questa patologia per raggiungere obiettivi terapeutici ottimali (10-26).

Evidenze scientifiche emergenti hanno dimostrato che l'aggressività tumorale potrebbe essere correlata con il genoma e con l'espressione anomala di alcuni geni. Pertanto, diversi studi si sono recentemente focalizzati sul ruolo dei microRNAs (miRNAs) nella tumori genesi del mesotelioma pleurico maligno.

I miRNAs sono dei piccoli (17–22 nucleotidi) RNAs a filamento singolo che non codificano per proteine e che sono coinvolti in moltissimi processi cellulari che regolano l'espressione genica(7). I miRNA nelle neoplasie sono spesso regolati in modo anomalo. In particolare, nelle cellule di MPM sono stati documentati molteplici profili di espressione dei miRNA rispetto alle cellule mesoteliali sane. Questo, potrebbe suggerire un potenziale ruolo dei miRNA sia come oncogeni che come oncosoppressori tumorali nell'oncogenesi tumorali.

Per definire meglio la diagnosi, e il trattamento del MPM si auspica la scoperta di nuove metodiche diagnostiche (8,10); per questo motivo la ricerca si è spinta nella definizione di nuovi fattori clinici prognostici. In aggiunta a questi nuovi marcatori biologici sono attualmente in corso di studio perché contribuiscano a predire l'evoluzione della malattia.

Attualmente non sono stati validati biomarcatori specifici in grado di diagnosticare il MPM, sebbene vi siano studi che mirano a questo obiettivo (27-31). L'identificazione di nuovi marcatori tumorali per il MPM potrebbero sicuramente contribuire alla diagnosi precoce ed al trattamento di questa patologia.

Per questo motivo, la seguente revisione bibliografica si pone come scopo quello di comunicare le recenti ricerche relative ad una nuova classe di marcatori chiamati microRNA.

Definizione dei miRNA

Biogenesi dei miRNA

I microRNA (miRNA) sono piccoli RNAs a filamento singolo non codificanti che agiscono come una nuova classe di geni regolatori (32) legandosi alla regione non tradotta 3' del loro geni mRNA bersaglio, con conseguente regolazione dell'espressione post- trascrizionale genetica.-

L'inibizione della traduzione del miRNA in proteine si verifica come conseguenza di un legame complementare parziale tra il miRNA e il suo bersaglio. In alternativa, il legame complementare completo comporta la degradazione del miRNA.

Funzione dei miRNA

Un singolo miRNA può regolare centinaia di bersagli a valle. Dunque, queste molecole giocano un ruolo importante in diversi processi cellulari inclusa la proliferazione, lo sviluppo, la differenziazione, l'apoptosi, la risposta agli stress; inoltre, sono espresse in modo aberrante in differenti neoplasie e potrebbero pertanto giocare un ruolo chiave nell'oncogenesi.

Recenti studi hanno riportato che i miRNAs sono marcatori biologici non invasivi che possono aprire nuove strade per la diagnosi precoce, e il trattamento di diverse neoplasie (33-35). Questo grazie ai loro profili di espressione tumore-specifici e la loro disponibilità nel sangue periferico (36-37). I miRNA potrebbero essere utili per definire profili che identificano differenti sottotipi tumorali (50-51).

Grazie alla loro specificità tissutale, i miRNA possono essere studiati per identificare la fonte tissutale della

metastasi (36-37).

La presenza dei miRNA nei fluidi umani come il siero, il plasma, la saliva e l'urina potrebbe essere d'aiuto per predire l'outcome clinico e la risposta al trattamento antineoplastico (38-41).

Recenti studi sperimentali in vitro hanno dimostrato la possibilità di modulare l'espressione di miRNA in diversi tipi di neoplasia, mostrando il loro potenziale uso come terapie antitumorali (42). Inoltre, potrebbero essere considerati come marcatori prognostici e questo è stato documentato in differenti tipologie neoplastiche (43-49).

Analisi dei miRNA

Le tecniche più comunemente utilizzate per indagare i miRNA sono le analisi di microarray e la real-time polymerase chain reaction quantitativa (qRT-PCR).

Il microarray profiling è uno strumento costituito da microscopiche sonde attaccate ad una superficie solida come vetro, plastica, o chip di silicio formanti un array (matrice) (52). Tali array permettono di esaminare simultaneamente la presenza di moltissimi geni all'interno di un campione. I microarray sfruttano una tecnica di ibridazione inversa, che consiste nel fissare tutti i segmenti di DNA (detti probe) su un supporto e nel marcare invece l'acido nucleico che vogliamo identificare (detto target). È una tecnica che è stata sviluppata negli anni '90 e oggi permette l'analisi dell'espressione genica monitorando in una sola volta gli RNA prodotti da migliaia di geni.

Per studiare gli mRNA, essi vengono prima estratti dalle cellule, convertiti in cDNA, con l'uso di un enzima chiamato trascrittasi inversa e allo stesso momento marcati con una sonda fluorescente. Quando si fa avvenire l'ibridazione fra la sonda presente sulla matrice e il cDNA target, quest'ultimo rimane legato alla sonda e può essere identificato semplicemente rilevando la posizione dove è rimasto legato.

Il secondo approccio è la qRT-PCR, uno strumento più sensibile di profiling quantitativo che consente di indagare i livelli di espressione di un singolo trascritto, consentendo l'amplificazione in tempo reale utilizzando primer combinati con specifici saggi [53].

Queste due tecniche dovrebbero essere utilizzate in combinazione per confermare i dati e renderli più veritieri, anche se in molti studi vengono presentati dei risultati ottenuti con l'utilizzo di un'unica tecnica.

Ruolo dei miRNA

Sono ancora pochi gli studi che hanno valutato la diversa espressione dei mRNAs con la speranza di migliorare la diagnosi del MPM ed il suo trattamento.

Tra queste ricerche, i primi studi riguardavano microarray utilizzati per analizzare l'espressione dei miRNAs espressi in modo differente tra i tessuti neoplastici e quelli normali (54).

Biomarcatori per l'identificazione precoce di MPM

Il desiderio di scoprire nuovi biomarcatori per identificare il MPM è in continua crescita e diversi studi sono stati coinvolti per definire l'accuratezza, la fattibilità e la specificità dei miRNAs come biomarcatori clinici. Sono stati riportati anomali incrementi dei livelli di miRNAs in differenti tipologie tumorali e gli autori suggeriscono che questi dati potrebbero essere utili per definire lo sviluppo e le progressione anche del MPM(55).

Inoltre, è stato documentato che il vascular endothelial growth factor (VEGF) è uno dei target di uno specifico miRNA, il miR-126. I pazienti affetti da MPM esibiscono un alto tasso di VEGF nel loro sangue (55).

Alcuni studi hanno dimostrato che l'espressione del miR-126 risulta diminuita nelle cellule neoplastiche che invece sono caratterizzate da un'aumentata espressione di VEGF, suggerendo come questo miRNA possa giocare il ruolo di oncosoppressore(56).

E' stata anche notata una correlazione tra i livelli di miR-126 riscontrati nel siero e SMRP, uno specifico marcatore del MPM in pazienti con un lato rischio di sviluppare MPM.

Quindi, si potrebbe ipotizzare che una associazione tra miR-126 e SMRP potrebbe essere utilizzata come marcatore di diagnosi precoce di MPM. Ulteriori ricerche hanno dimostrato che miR-126 sembrerebbe distinguere i pazienti affetti da MPM, rispetto a quelli con NSCLC (non small cell lung cancer); infatti, sono stati riscontrati dei bassi livelli di miR-126 circolante nel MPM rispetto ai campioni di NSCLC (57).

Tuttavia questo marcatore manca di specificità tumorale e risulta espresso a bassi livelli anche in altre tipologie neoplastiche. Per questo motivo, potrebbe essere utilizzato non da solo, ma in associazione ad altri marcatori, come per esempio la mesotelina (57)

Diagnosi

A tutt'oggi, risulta difficile la differenziazione tra il MPM e gli adenocarcinomi o le metastasi epiteliali di altre neoplasie e, a causa dell'assenza di marcatori accurati, l'espressione dei miRNA potrebbe essere considerata come un'opzione interessante per ottenere una miglior diagnosi differenziale.

Alcuni studi hanno dimostrato che differenti pattern di espressione di miRNA sono in grado di distinguere tra MPM, adenocarcinoma polmonare o altre neoplasie coinvolgenti la pleura (58-59).

Da recenti ricerche sembra che alcuni miRNA (miR-17-92) appaiano up-regolati nelle cellule di MPM, mentre altri miRNA risultano down-regolati come succede solitamente anche in altre tipologie di tumore (miR-31, miR-221, miR-222) (60-61).

Tuttavia, alcuni studi statistici, hanno dimostrato che, sebbene specifici miRNA (miR-17-5p, miR-30, miR-221, miR-222) siano più caratteristici di alcune tipologie istologiche tumorali, non possono essere considerati dei marcatori diagnostici per differenziare il MPM dalle proliferazioni mesoteliali maligne (58,59,61,63).

Un ulteriore promettente marcatore potrebbe essere il miR-625-3p. Infatti, alcuni studi hanno dimostrato la sua up-regolazione in pazienti affetti da MPM rispetto ai controlli (65).

Il marcatore miR-103 sembrerebbe, invece, in grado di differenziare tra la diagnosi di MPM e quella dei controlli che dichiaravano esposizione all'asbesto (66).

Fattori prognostici

I miRNAs sono stati studiati anche come fattori prognostici.

In particolare, alcuni autori hanno notato che possono suddividere la popolazione di pazienti in due gruppi: quello a buona e quello a cattiva prognosi in base al profilo di espressione di specifici miRNA (67-69).

Il miR-29 è considerato un fattore prognostico in termini di ricaduta e di sopravvivenza dopo una citoinduzione chirurgica: infatti, la sua espressione sembrerebbe aumentare nei pazienti affetti da mesotelioma maligno epiteliali rispetto a quelli non epiteliali.

Alti livelli di espressione di miR-29 sembrano predire una prognosi più favorevole rispetto ai pazienti che hanno una ridotta espressione di questo miRNA. Probabilmente miR-29 ha un ruolo nell'inibizione della proliferazione, della migrazione, dell'invasione cellulare e della formazione di colonie.

Altri miRNA sono invece associati ad una peggior prognosi, come per esempio nel caso di miR-31. Inoltre, alcuni miRNA sembrerebbero specifici di alcuni sottogruppi istologici di mesotelioma pleurico maligno, come per esempio: miR-17-5p, miR-29a, miR-30e-5p, miR-106a e miR-143 (64).

Altri miRNA sono stati considerati come caratterizzati da valore prognostico. Per esempio, il mi-17-5p e il miR-30c sembrerebbero identificare MPM sarcomatoidi con miglior outcome.

E' importante ricordare che, oltre che come marcatori prognostici, i miRNA sono stati investigati per il loro possibile ruolo di marcatori predittivi ed i risultati appaiono interessanti (54, 55, 58, 59, 61, 63).

Potenziali bersagli per la terapia antitumorale

Alcuni autori hanno studiato il ruolo di biomarcatori dei miRNA.

Diversi ricerche hanno dimostrato che esiste un vero e proprio pattern di miRNA che consente di distinguere tra le culture cellulari di mesotelioma maligno e quello di cellule mesoteliali sane (63). I geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare risultano essere bersaglio di diversi mRNA come per esempio quelli membri del cluster onco-miR miR-17-92 (miR 17-5p, 18a, 19b, 20a, 25, 92, 106a, 106b).

Inoltre, esistono specifici miRNA come per esempio miR-31 che potrebbero essere utili nella definizione di nuovi approcci terapeutici al MPM.

Infatti, studi funzionali hanno dimostrato che la ri-espressione forzata di questo miRNA sembrerebbe comportare una soppressione del ciclo cellulare ed una inibizione di importanti fattori implicati nella replicazione del DNA e nella progressione del ciclo cellulare.

E' stato dimostrato, dunque, che il miR-31 ha una proprietà tumorale soppressiva suggerendo la possibilità di sviluppare nuovi agenti terapeutici contro il MPM ed altre tipologie di tumori che esprimano la perdita del cromosoma 9p21.3 (71).

Un altro miRNA studiato a lungo è stato il miR-34b/c che sembrerebbe giocare un ruolo del silenziamento genico e nella soppressione di alcune caratteristiche oncologiche. Anche in questo caso l'espressione forzata di questo miRNA è risultata in un marcato effetto antineoplastico, secondario all'arresto del ciclo cellulare, alla soppressione della migrazione, dell'invasione e della motilità cellulare. Anche il miRNA potrebbe avere delle implicazioni terapeutiche importanti in un prossimo futuro (72- 73).

Cellule trasfettate con inibitori di miR-34s sono caratterizzate da un incremento della proliferazione, della migrazione e dell'invasione cellulare (74).

E' stato notato che metilazioni di miR-34b/c circolanti nel siero sono caratteristiche di campioni di MPM (75). Il trattamento con ranpirnase (onconase) induce un incremento dell'espressione di miR-17, che comporta una down-regolazione dell'espressione di miR-30 e del NF- κ B, che a sua volta si traduce in un aumento dell'apoptosi e in una conseguente riduzione dell'aggressività tumorale (77).

Il miR-1 sembrerebbe avere un ruolo di oncosoppressore nella terapia del MPM (80). Infatti, miR-1 risulta down- regolato nelle linee cellulari di MPM rispetto al mesotelio normale (78-79).

Nelle linee cellulari di mesotelioma è stata notata una diminuzione dell'espressione di miR-15 e di miR- 16. Quando questi miRNA venivano espressi forzatamente si notava una inibizione della crescita delle linee cellulari di MPM (81-85).

Conclusioni e prospettive future

Tutti gli studi presentati in questa revisione bibliografica rivelano un'importanza dei miRNAs nel MPM dovuta ai loro potenziali ruoli sia come marcatori diagnostici e prognostici sia come agenti antineoplastici nel trattamento di questa patologia.

Anche la Fondazione Buzzi ha finanziato ricerche nell'ambito dei miRNA ed in particolare, è possibile consultare la scheda relativa al progetto in corso: "New targets in mesothelioma cells: hitting translational control and mirnas". In questo progetto i ricercatori sono riusciti a descrivere una "signature" di miRNA presente in tessuti di mesotelioma. Hanno quindi proceduto ad analizzare in 10 linee cellulari di mesotelioma il grado di espressione di questi ed altri miRNA. Gli studiosi hanno evidenziato, inoltre, una situazione estremamente eterogenea. In sintesi, è sostanzialmente difficile allo stato attuale definire se e quali miRNA abbiano un significato diagnostico, prognostico o un potenziale terapeutico. I risultati sono in linea con l'eterogeneità esistente in letteratura circa i miRNA nel mesotelioma. L'esame dei dati disponibili, però, indica non solo eterogeneità nel tumore ma anche nelle tecniche analitiche. In questo contesto, i ricercatori hanno deciso di mettere a punto una tecnica innovativa per definire in maniera non ambigua quali miRNA siano

espressi in tessuti umani di mesotelioma. Questo è un passo necessario per capire se alcuni miRNA sono dei marcatori effettivi. La tecnologia potrebbe essere trasferita ai laboratori diagnostici in un futuro prossimo. Pochi sono gli studi che in realtà si sono focalizzati sull'espressione dei miRNA nel MPM e, dunque, non è sorprendente che vi siano dei risultati discordanti tra i differenti istotipi, le diverse fonti di campionamento utilizzate nelle ricerche in vitro e in vivo, i gruppi di controllo, gli approcci, le tecniche di normalizzazione e le analisi con qRT-PCR e microarray.

Sono necessari ulteriori studi, standardizzati, multicentrici, con tecniche omologate e normalizzate. In conclusione, tutti i risultati mostrati confermano la rilevanza dei miRNAs nella diagnosi, nella prognosi e nel trattamento del MPM. Tutti questi dati andrebbero validati in modo uniforme per identificare gli miRNA come potenziali marcatori predittivi e prognostici.

Sicuramente i recenti progressi in questo campo contribuiscono alla definizione di prospettive future fondate su nuovi approcci di trattamento e nuove opportunità di protocolli sperimentali terapeutici.

Reference

- Wagner JC, Sleggs CA, Marchand P (1960) Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the North Western Cape Province. *Br J Ind Med* 17:260–271
- Albin M, Magnani C, Krstev S, Rapiti E, Sheferl I (1999) Asbestos and cancer: an overview of current trends in Europe. *Environ Health Perspect* 107(Suppl 2):289–298
- Ismail-Khan R, Robinson LA, Williams CC Jr, Garrett CR, Bepler G, Simon GR (2006) Malignant pleural mesothelioma: a comprehensive review. *Cancer Control* 13:255–263
- Carbone M, Kratzke RA, Testa JR (2002) The pathogenesis of mesothelioma. *Semin Oncol* 29:2–17
- Kaufman AJ, Pass HI (2008) Current concepts in malignant pleural mesothelioma. *Expert Rev Anticancer Ther* 8:293–303
- Bridda A, Padoan I, Mencarelli R, Frego M (2007) Peritoneal mesothelioma: a review. *MedGenMed* 9:32
- Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, Biffo S, Merrick WC, Darzynkiewicz E, Pillai RS, Filipowicz W, Duchaine TF, Sonenberg N. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science*. 2007 Sep 21;317(5845):1764-7. Epub 2007 Jul 26.
- Husain AN, Colby T, Ordonez N, Krausz T, Attanoos R, Beasley MB, Borczuk AC, Butnor K, Cagle PT, Chiriac LR, Churg A, Dacic S, Fraire A, Galateau-Salle F, Gibbs A, Gown A, Hammar S, Litzky L, Marchevsky AM, Nicholson AG, Roggli V, Travis WD, Wick M, International Mesothelioma Interest Group (2013) Guidelines for pathologic diagnosis of malignant mesothelioma: 2012 update of the consensus statement from the International Mesothelioma Interest Group. *Arch Pathol Lab Med* 137:647–667
- Grondin SC, Sugarbaker DJ (1999) Malignant mesothelioma of the pleural space. *Oncology (Williston Park)* 13:919–926 (discussion 926, 931– 932)
- Neumann V, Löseke S, Nowak D, Herth FJ, Tannapfel A (2013) Malignant pleural mesothelioma: incidence, etiology, diagnosis, treatment, and occupational health. *Dtsch Arztebl Int* 110:319–326
- Bölükbas S, Schirren J (2013) Malignant pleural mesothelioma : Comparison of radical pleurectomy und extrapleural pneumonectomy. *Chirurg* 84:487–491
- Rice D (2011) Surgical therapy of mesothelioma. *Recent Results Cancer Res* 189:97–125
- Cao C, Tian D, Manganas C, Matthews P, Yan TD (2012) Systematic review of trimodality therapy for patients with malignant pleural mesothelioma. *Ann Cardiothorac Surg* 1:428–437
- Kaufman AJ, Flores RM (2011) Surgical treatment of malignant pleural mesothelioma. *Curr Treat Options Oncol* 12:201–216
- Butchart EG, Ashcroft T, Barnsley WC, Holden MP (1976) Pleuropneumonectomy in the management of diffuse malignant mesothelioma of the pleura. Experience with 29 patients. *Thorax* 31:15–24
- Stewart DJ, Martin-Ucar A, Pilling JE, Edwards JG, O'Byrne KJ, Waller DA (2004) The effect of extent of local resection on patterns of disease progression in malignant mesothelioma. *Ann Thorac Surg* 78:245–252
- Treasure T, Lang- Lazdunski L, Waller D, Bliss JM, Tan C, Entwisle J, Snee M, O'Brien M, Thomas G, Senan S, O'Byrne K, Kilburn LS, Spicer J, Landau D, Edwards J, Coombes G, Darlison L, Peto J, MARS trialists (2011) Extra-pleural pneumonectomy versus no extra-pleural pneumonectomy for patients with malignant pleural mesothelioma: clinical outcomes of the Mesothelioma and Radical Surgery (MARS) randomised feasibility study. *Lancet Oncol* 12:763–772
- Soysal O, Karaoglanoglu N, Demircan S, Topçu S, Taştepe I, Kaya S, Unlü M, Celtin G (1997) Pleurectomy/decortication for palliation in malignant pleural mesothelioma: results of surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 11:210–213
- Vogelzang NJ, Rusthoven JJ, Symanowski J, Denham C, Kaukel E, Ruffie P, Gatzemeier U, Boyer M, Emri S, Manegold C, Niyikiza C, Paoletti P (2003) Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol* 21:2636–2644
- van Meerbeeck JP, Gaafar R, Manegold C, Klavereen RJ, Van Marck EA, Vincent M, Legrand C, Bottomley A, Debruyne C, Giaccone G, European Organisation for Research and Treatment of Cancer Lung Cancer Group; National Cancer Institute of Canada (2005) Randomized phase III study of cisplatin with or without raltitrexed in patients with malignant pleural mesothelioma: an intergroup study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Lung Cancer Group and the National Cancer Institute of Canada. *J Clin Oncol* 23:6881–6889 2876 A. Truini et al. 1 3
- van Meerbeeck JP, Baas P, Debruyne C, Groen HJ, Manegold C, Ardizzoni A, Gridelli C, van Marck EA, Lentz M, Giaccone G (1999) A phase II study of gemcitabine in patients with malignant pleural mesothelioma. European Organization for Research and Treatment of Cancer Lung Cancer Cooperative Group. *Cancer* 85:2577–2582
- Stebbing J, Powles T, McPherson K, Shamash J, Wells P, Sheaff MT, Slater S, Rudd RM, Fennell D, Steele JP (2009) The efficacy and safety of weekly vinorelbine in relapsed malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer* 63:94–97
- Scherpereel A, Astoul P, Baas P, Berghmans T, Clayson H, de Vuyst P, Galateau-Salle F, Hennequin C, Hillerdal G, Le Péchoux C, Mutti L, Paire JC, Stahel R, van Houtte P, van Meerbeeck J, Waller D, Weder W, European Respiratory Society/European Society of Thoracic Surgeons Task Force (2010) Guidelines of the European Respiratory Society and the European Society of Thoracic Surgeons for the management of malignant pleura mesothelioma. *Eur Respir J* 35:479–495
- Dhalluin X, Scherpereel A (2011) Chemotherapy and radiotherapy for mesothelioma. *Recent Results Cancer Res* 189:127–147
- Siemel W, Kirschbaum A, Passlick B (2008) Multimodal therapy for malignant pleural mesothelioma including extrapleural pneumonectomy. *Zentralbl Chir* 133:231–237
- Sugarbaker DJ, Garcia JP, Richards WG, Harpole DH Jr, Healy-Baldini E, DeCamp MM Jr, Mentzer SJ, Liptay MJ, Strauss GM, Swanson SJ (1996) Extrapleural pneumonectomy in the multimodality therapy of malignant pleural mesothelioma. Results in 120 consecutive patients. *Ann Surg* 224:288–294 (discussion 294–296)
- Klebe S, Henderson DW (2011) Early stages of mesothelioma, screening and biomarkers. *Recent Results Cancer Res* 189:169–193
- Paganuzzi Onetto M, Marroni P, Filiberti R, Tassara E, Parodi S, Felletti R (2011) Diagnostic value of CYFRA 21-1 tumor marker and CEA in pleural effusion due to mesothelioma. *Chest* 119:1138–1142
- Onda M, Nagata S, Ho M, Bera TK, Hassan R, Alexander RH, Pastan I (2006) Megakaryocyte potentiation factor cleaved from mesothelin precursor is a useful tumor marker in the serum of patients with mesothelioma. *Clin Cancer Res* 12:4225–4423
- Pass HI, Lott D, Lonardo F, Harbut M, Liu Z, Tang N, Carbone M, Webb C, Wali A (2005) Asbestos exposure, pleural mesothelioma, and serum osteopontin levels. *N Engl J Med* 353:1564–1573
- Robinson BW, Creaney J, Lake R, Nowak A, Musk AW, de Klerk N, Winzell P, Hellstrom KE, Hellstrom I (2003) Mesothelin- family proteins and diagnosis of mesothelioma. *Lancet* 362:1612–1616
- Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281– 297
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ (2006) Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6:259–269
- Bentwich I (2005) Prediction and validation of microRNAs and their targets. *FEBS Lett* 579:5904– 5910
- Jean D, Daubriac J, Le Pimec-Barthes F, Galateau-Salle F, Jaurand MC (2012) Molecular changes in mesothelioma with an impact on prognosis and treatment. *Arch Pathol Lab Med* 136:277–293
- Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, Rosenwald S, Spector Y, Zepeniuk M, Benjamin H, Shabes N, Tabak S, Levy A, Lebanony D, Goren Y, Silberschein E, Targan N, Ben-Ari A, Gilad S, Sion-Vardy N, Tobar A, Feinmesser M, Kharenko O, Nativ O, Nass D, Perelman M, Yosepovich A, Shalmon B, Polak-Charcon S, Fridman E, Avniel A, Bentwich I, Bentwich Z, Cohen D, Chajut A, Barshack I (2008) MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat Biotechnol* 26:462– 469
- Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, Benjamin H, Kushnir M, Cholakh H, Melamed N, Bentwich Z, Hod M, Goren Y, Chajut A (2008) Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One* 3:e3148
- Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K (2010) The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 56:1733–1741
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova- Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen

- BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:10513–10518
40. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY (2008) Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 18:997–1006
41. McDonald JS, Milosevic D, Reddi HV, Grebe SK, Algeciras-Schimnich A (2011) Analysis of circulating microRNA: preanalytical and analytical challenges. *Clin Chem* 57:833–840
42. Fabbri M (2013) MicroRNAs and cancer: towards a personalized medicine. *Curr Mol Med* 13:751–756
43. 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 (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:15524–15529
44. Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, Sweeney KJ, Kerin MJ (2009) MicroRNAs as novel biomarkers for breast cancer. *J Oncol* 2009:950201
45. Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, Falconi M, Capelli P, Bersani S, Calin GA, Volinia S, Liu CG, Scarpa A, Croce CM (2006) MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol* 24:4677–4684
46. Xu YZ, Xi QH, Ge WL, Zhang XQ (2013) Identification of serum microRNA-21 as a biomarker for early detection and prognosis in human epithelial ovarian cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 14:1057–1060
47. Raponi M, Dossey L, Jatkoet T, Wu X, Chen G, Fan H, Beer DG (2009) MicroRNA classifiers for predicting prognosis of squamous cell lung cancer. *Cancer Res* 69:5776–5783
48. Pass HI, Beer DG, Joseph S, Massion P (2013) Biomarkers and molecular testing for early detection, diagnosis, and therapeutic prediction of lung cancer. *Thorac Surg Clin* 23:211–224
49. Nadal E, Chen G, Gallegos M, Lin L, Ferrer-Torres D, Truini A, Wang Z, Lin J, Reddy RM, Llatjos R, Escobar I, Moya J, Chang AC, Cardenal F, Capella G, Beer DG (2013) Epigenetic inactivation of microRNA-34b/c predicts poor disease-free survival in early stage lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 19:6842–6852
50. Minoia C, Sturchio E, Porro B, Ficociello B, Zambelli A, Imbriani M (2011) MicroRNAs as biological indicators of environmental and occupational exposure to asbestos. *G Ital Med Lav Ergon* 33:420–434
51. Calin GA, Croce CM (2006) MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 6:857–866
52. Yin JQ, Zhao RC, Morris KV (2008) Profiling microRNA expression with microarrays. *Trends Biotechnol* 26:70–76
53. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahavakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 33:e179
54. Guled M, Lahti L, Lindholm PM, Salmenkivi K, Bagwan I, Nicholson AG, Knuutila S (2009) CDKN2A, NF2, and JUN are dysregulated among other genes by miRNAs in malignant Role of microRNAs 2877 1 3 mesothelioma—a miRNA microarray analysis. *Genes Chromosomes Cancer* 48:615–623
55. Santarelli L, Straffella E, Staffolani S, Amati M, Emanuelli M, Sartini D, Pozzi V, Carbonari D, Bracci M, Pignotti E, Mazzanti P, Sabbatini A, Ranaldi R, Gasparini S, Neuzil J, Tomassetti M (2011) Association of miR-126 with soluble mesothelin-related peptides, a marker for malignant mesothelioma. *PLoS One* 6:e18232
56. Liu B, Peng XC, Zheng XL, Wang J, Qin YW (2009) MiR-126 restoration down-regulate VEGF and inhibit the growth of lung cancer cell lines in vitro and in vivo. *Lung Cancer* 66:169–175
57. Tomassetti M, Staffolani S, Nocchi L, Neuzil J, Straffella E, Manzella N, Mariotti L, Bracci M, Valentino M, Amati M, Santarelli L (2012) Clinical significance of circulating miR-126 quantification in malignant mesothelioma patients. *Clin Biochem* 45:575–581
58. Benjamin H, Lebanony D, Rosenwald S, Cohen L, Gibori H, Barabash N, Ashkenazi K, Goren E, Meiri E, Morgenstern S, Perelman M, Barshack I, Goren Y, Edmonston TB, Chajut A, Aharonov R, Bentwich Z, Rosenfeld N, Cohen D (2010) A diagnostic assay based on microRNA expression accurately identifies malignant pleural mesothelioma. *J Mol Diagn* 12:771–779
59. Gee GV, Koestler DC, Christensen BC, Sugarbaker DJ, Ugolini D, Ivaldi GP, Resnick MB, Houseman EA, Kelsey KT, Marsit CJ (2010) Downregulated microRNAs in the differential diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Int J Cancer* 127:2859–2869
60. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM (2006) A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:2257–2261
61. Busacca S, Germano S, De Cecco L, Rinaldi M, Comoglio F, Favero F, Murer B, Mutti L, Pierotti M, Gaudino G (2010) MicroRNA signature of malignant mesothelioma with potential diagnostic and prognostic implications. *Am J Respir Cell Mol Biol* 42:312–319
62. Andersen M, Grauslund M, Muhammad-Ali M, Ravn J, Sørensen JB, Andersen CB, Santoni Rugiu E (2012) Are differentially expressed microRNAs useful in the diagnostics of malignant pleural mesothelioma? *APMIS* 120:767–769
63. Balatti V, Maniero S, Ferracin M, Veronese A, Negrini M, Ferrocci G, Martini F, Tognon MG (2011) MicroRNAs dysregulation in human malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Oncol* 6:844–851
64. Pass HI, Goparaju C, Ivanov S, Donington J, Carbone M, Hoshen M, Cohen D, Chajut A, Rosenwald S, Dan H, Benjamin S, Aharonov R (2010) hsa-miR-29c* is linked to the prognosis of malignant pleural mesothelioma. *Cancer Res* 70:1916–1924
65. Kirschner MB, Cheng YY, Badrian B, Kao SC, Creaney J, Edelman JJ, Armstrong NJ, Vallely MP, Musk AW, Robinson BW, McCaughan BC, Klebe S, Mutsaers SE, van Zandwijk N, Reid G (2012) Increased circulating miR-625-3p: a potential biomarker for patients with malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Oncol* 7:1184–1191
66. Weber DG, Johnen G, Bryk O, Jöckel KH, Brüning T (2012) Identification of miRNA-103 in the cellular fraction of human peripheral blood as a potential biomarker for malignant mesothelioma—a pilot study. *PLoS ONE* 7:e30221
67. Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zaneni N, Callegari E, Liu S, Alder H, Costinean S, Fernandez-Cymering C, Volinia S, Guler G, Morrison CD, Chan KK, Marcucci G, Calin GA, Huebner K, Croce CM (2007) MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:15805–15810
68. Pekarsky Y, Santanam U, Cimmino A, Palamarchuk A, Efanov A, Maximov V, Volinia S, Alder H, Liu CG, Rassenti L, Calin GA, Hagan JP, Kipps T, Croce CM (2006) Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res* 66:11590–11593
69. Gebeshuber CA, Zatloukal K, Martinez J (2009) miR-29a suppresses tristetraprolin, which is a regulator of epithelial polarity and metastasis. *EMBO Rep* 10:400–405
70. Ivanov SV, Miller J, Lucito R, Tang C, Ivanova AV, Pei J, Carbone M, Cruz C, Beck A, Webb C, Nonaka D, Testa JR, Pass HI (2009) Genomic events associated with progression of pleural malignant mesothelioma. *Int J Cancer* 124:589–599
71. Ivanov SV, Goparaju CM, Lopez P, Zavadil J, Toren-Haritan G, Rosenwald S, Hoshen M, Chajut A, Cohen D, Pass HI (2010) Pro-tumorigenic effects of miR-31 loss in mesothelioma. *J Biol Chem* 285:22809–22817
72. Kubo T, Toyooka S, Tsukuda K, Sakaguchi M, Fukazawa T, Soh J, Asano H, Ueno T, Muraoka T, Yamamoto H, Nasu Y, Kishimoto T, Pass HI, Matsui H, Huh NH, Miyoshi S (2011) Epigenetic silencing of microRNA-34b/c plays an important role in the pathogenesis of malignant pleural mesothelioma. *Clin Cancer Res* 17:4965–4974
73. Maki Y, Asano H, Toyooka S, Soh J, Kubo T, Katsui K, Ueno T, Shien K, Muraoka T, Tanaka N, Yamamoto H, Tsukuda K, Kishimoto T, Kanazawa S, Miyoshi S (2012) MicroRNA miR-34b/c enhances cellular radiosensitivity of malignant pleural mesothelioma cells. *Anticancer Res* 32:4871–4875

74. Tanaka N, Toyooka S, Soh J, Tsukuda K, Shien K, Furukawa M, Muraoka T, Maki Y, Ueno T, Yamamoto H, Asano H, Otsuki T, Miyoshi S (2013) Downregulation of microRNA-34 induces cell proliferation and invasion of human mesothelial cells. *Oncol Rep* 29:2169–2174
75. Muraoka T, Soh J, Toyooka S, Aoe K, Fujimoto N, Hashida S, Maki Y, Tanaka N, Shien K, Furukawa M, Yamamoto H, Asano H, Tsukuda K, Kishimoto T, Otsuki T, Miyoshi S (2013) The degree of microRNA-34b/c methylation in serum-circulating DNA is associated with malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer* [Epub ahead of print]
76. Khodayari N, Mohammed KA, Goldberg EP, Nasreen N (2011) EphrinA1 inhibits malignant mesothelioma tumor growth via let-7 microRNA-mediated repression of the RAS oncogene. *Cancer Gene Ther* 18:806–816
77. Goparaju CM, Blasberg JD, Volinia S, Palatini J, Ivanov S, Donington JS, Croce C, Carbone M, Yang H, Pass HI (2011) ONCONASE- mediated NFKB downregulation in malignant pleural mesothelioma. *Oncogene* 30:2767–2777
78. Datta J, Kutay H, Nasser MW, Nuovo GJ, Wang B, Majumder S, Liu CG, Volinia S, Croce CM, Schmittgen TD, Ghoshal K, Jacob ST (2008) Methylation mediated silencing of MicroRNA-1 gene and its role in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Res* 68:5049–5058
79. Yoshino H, Chiyomaru T, Enokida H, Kawakami K, Tatarano S, Nishiyama K, Nohata N, Seki N, Nakagawa M (2011) The tumour- suppressive function of miR-1 and miR-133a targeting TAGLN2 in bladder cancer. *Br J Cancer* 104:808–818
80. Xu Y, Zheng M, Merritt RE, Shrager JB, Wakelee H, Kratzke RA, Hoang CD (2013) miR-1 induces growth arrest and apoptosis in malignant mesothelioma. *Chest* 144:1632–1643
81. Bonci D, Coppola V, Musumeci M, Addario A, Giuffrida R, Memeo L, D'Urso L, Pagliuca A, Biffoni M, Labbaye C, Bartucci M, Muto G, Peschle C, De Maria R (2008) The miR-15amiR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nat Med* 14:1271–1277
82. Bandi N, Zbinden S, Gugger M, Arnold M, Kocher V, Hasan L, Kappeler A, Brunner T, Vassella E (2009) miR-15a and miR-16 are implicated in cell cycle regulation in a Rb-dependent manner and are frequently deleted or down-regulated in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 69:5553–5559 2878 A. Truini et al. 1 3
83. Wang X, Wang J, Ma H, Zhang J, Zhou X (2012) Downregulation of miR-195 correlates with lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Med Oncol* 29:919–927
84. Bhattacharya R, Nicoloso M, Arvizo R, Wang E, Cortez A, Rossi S, Calin GA, Mukherjee P (2009) MiR-15a and MiR-16 control Bmi-1 expression in ovarian cancer. *Cancer Res* 69:9090–9095
85. Reid G, Pel ME, Kirschner MB, Cheng YY, Mugridge N, Weiss J, Williams M, Wright C, Edelman JJ, Vallely MP, McCaughan BC, Klebe S, Brahmabhatt H, Macdiarmid JA, van Zandwijk N (2013) Restoring expression of miR-16: a novel approach to therapy for malignant pleural mesothelioma. *Ann Oncol* 24:3128–3135