

Artykuł ten przedstawia w zarysie aktualny stan wiedzy w zakresie biogenezy, mechanizmu działania oraz funkcji fizjologicznej mikroRNA, niedawno odkrytych, bardzo ważnych regulatorów procesów proliferacji komórek, ich różnicowania i apoptozy, a także embriogenezy i organogenezy. Szerzej potraktowana jest zgromadzona dotąd wiedza na temat związków mikroRNA z chorobami nowotworowymi oraz możliwości wykorzystania mikroRNA w diagnostyce, prognostyce i terapii nowotworów. Zasygnalizowany jest również potencjalny związek mutacji germinalnych genów mikroRNA z predyspozycjami do nowotworów.

**Słowa kluczowe:** biogeneza mikroRNA, funkcja mikroRNA, profile ekspresji mikroRNA, mikroRNA jako onkogeny, mikroRNA jako supresory nowotworów.

## Rola mikroRNA w patogenezie, diagnostyce i terapii nowotworów

*Role of microRNA in pathogenesis, diagnostics and therapy of cancer*

Karolina Majorek<sup>1</sup>, Włodzimierz J. Krzyżosiak<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu;

<sup>2</sup>Pracownia Genetyki Nowotworów Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

### Wstęp

Poszukiwania genów, których rozmaite zaburzenia funkcji mogą prowadzić do nowotworów trwają już trzecią dekadę. Zidentyfikowano dotąd trzy szerokie grupy genów nowotworowych: onkogeny, geny supresorowe i geny odpowiedzialne za stabilność genomu. Są one znajdowane w tkance nowotworowej w postaci zmutowanej i mają związek przyczynowo-skutkowy z etiopatogenezą nowotworów. Wszystkie są genami kodującymi białka. Dysfunkcja poznanych już genów nie jest jednak w stanie dać pełnego obrazu zmian molekularnych występujących w nowotworach. Niedawno na scenie badań genetyki nowotworów pojawili się całkowicie nowi aktorzy – mikroRNA. O występowaniu w genomie człowieka genów kodujących te niewielkie RNA nie wspominały jeszcze ani słowem dwie epokowe prace przedstawiające na początku 2001 roku pierwsze sekwencje ludzkiego genomu. Obecnie u człowieka znanych jest już prawie 500 genów mikroRNA i przypuszcza się, że drugie tyle zostanie wkrótce znalezionych. Sądzę się, że regulują one ekspresję około połowy ludzkich genów i praktycznie każdy szlak komórkowy znajduje się pod ich wpływem. Badania ostatnich lat wskazują, iż mikroRNA mogą odegrać ogromną rolę w diagnostyce i terapii nowotworów. Artykuł ten przedstawia w zarysie aktualny stan wiedzy w dziedzinie badań związku mikroRNA z nowotworami.

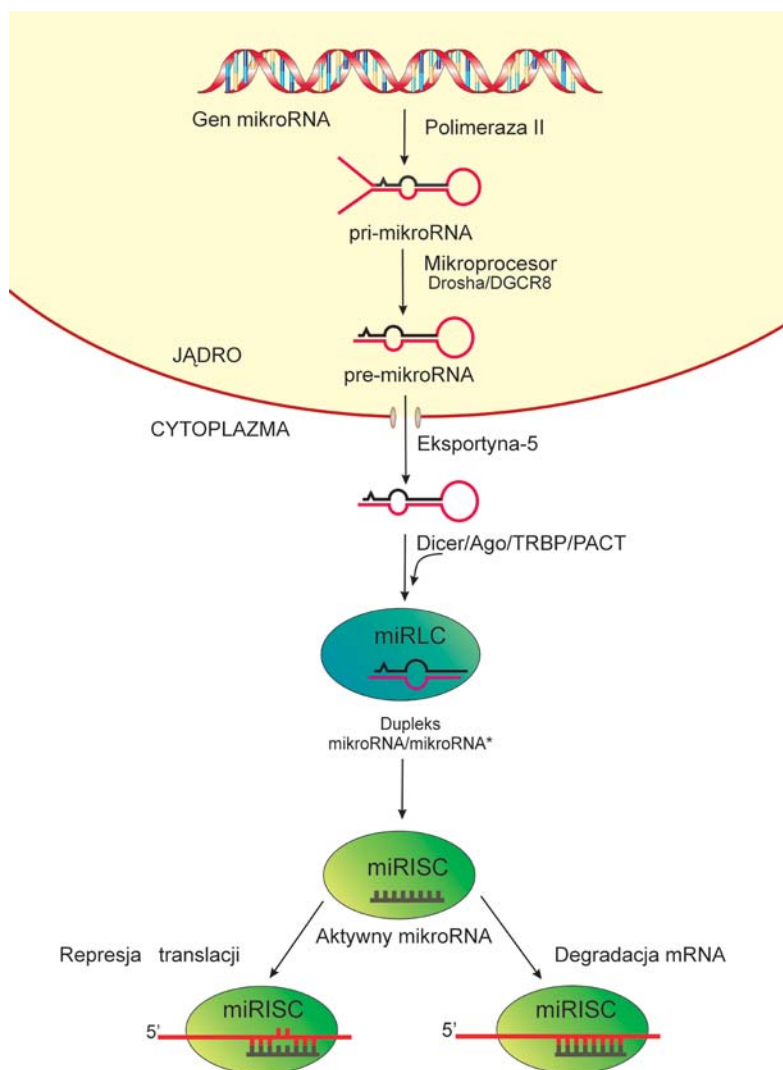
### Biogeneza i mechanizm działania mikroRNA

MikroRNA są klasą krótkich około 20-nukleotydowych jednoniciowych niekodujących cząsteczek RNA, których rolę, obserwowaną u organizmów jądrowych, jest obniżanie ekspresji genów na etapie translacji informacji genetycznej [1]. Proces biogenezy oraz mechanizm działania mikroRNA przedstawia ryc. 1.

Geny mikroRNA, występują zarówno między genami kodującymi białka lub niekodujące RNA, jak i w intronach, a nawet egzonach tych genów. Transkrybowane są przez polimerazę II RNA, która generuje pierwotne prekursor (pri-mikroRNA), w skład których wchodzi fragmenty o strukturze długiej, nieregularnej spinki [2]. Dojrzewanie mikroRNA zachodzi w dwóch etapach, katalizowanych przez rybonukleazy Drosha i Dicer, należące do rodziny RNaz III. Etap przycinania pri-mikroRNA do pre-mikroRNA zachodzi w jądrze komórkowym i przeprowadzany jest przez kompleks Mikroprocesora. W jego skład wchodzi Drosha i białko DGCR8, [3]. Pre-mikroRNA jest następnie transportowany do cytoplazmy, gdzie zachodzi kolejny etap biogenezy. Za transport przez kompleks porów jądrowych odpowiedzialna jest Eksportyna-5 (Exp-5), która wiąże pre-mikroRNA współdziałając z białkiem Ran zależnym od GTP [4]. Etap cytoplazmatyczny biogenezy mikroRNA, którego produktem jest dupleks mikroRNA/mikroRNA\*, przeprowadzany jest przez rybonukleazę Dicer. Występuje ona zwykle w kompleksie z białkami Argonate (Ago) oraz TRBP i/lub PACT [5]. Białka te pozostają również w składzie aktywnego kompleksu wyciszającego ekspresję genów.

This article presents in brief some basic facts regarding biogenesis and physiological function of microRNAs, which are potent regulators of cell proliferation, differentiation, apoptosis, embryogenesis and organogenesis. The recently revealed links between microRNA dysfunction and human cancers are more extensively discussed, and some examples and perspectives of microRNA application in diagnostics, prognostics and therapy of cancer are presented. The postulated connection between germline mutations in microRNA genes and predisposition to cancer is also discussed.

**Key words:** microRNA biogenesis, microRNA function, microRNA expression profiles, microRNAs as oncogenes, microRNAs as tumour suppressors.



Ryc. 1. Biogeneza i mechanizm regulacji genów przez mikroRNA

Fig. 1. MicroRNA biogenesis and mechanism of gene regulation

MikroRNA funkcjonują jako składniki kompleksu rybonukleoproteinowego nazywanego miRISC (ang. *microRNA induced silencing complex*). W zależności od stopnia komplementarności sekwencji mikroRNA do miejsca jego wiązania w mRNA oraz rodzaju białka Ago wchodzącego w skład miRISC, może on prowadzić do nukleolitycznego przecięcia mRNA, bądź represji jego translacji [6]. Większość zwierzęcych mikroRNA wiąże się z przynajmniej kilkoma częściowo komplementarnymi miejscami, występującymi przeważnie w 3'UTR. Ich działanie jest kooperatywne, czego efektem jest inhibicja syntezy białka, przy czym poziom transkryptu zwykle nie ulega zmianie [7]. Regulowane transkrypty są następnie transportowane do miejsc ich przechowywania i/lub degradacji nazywanych ciątkami P [8].

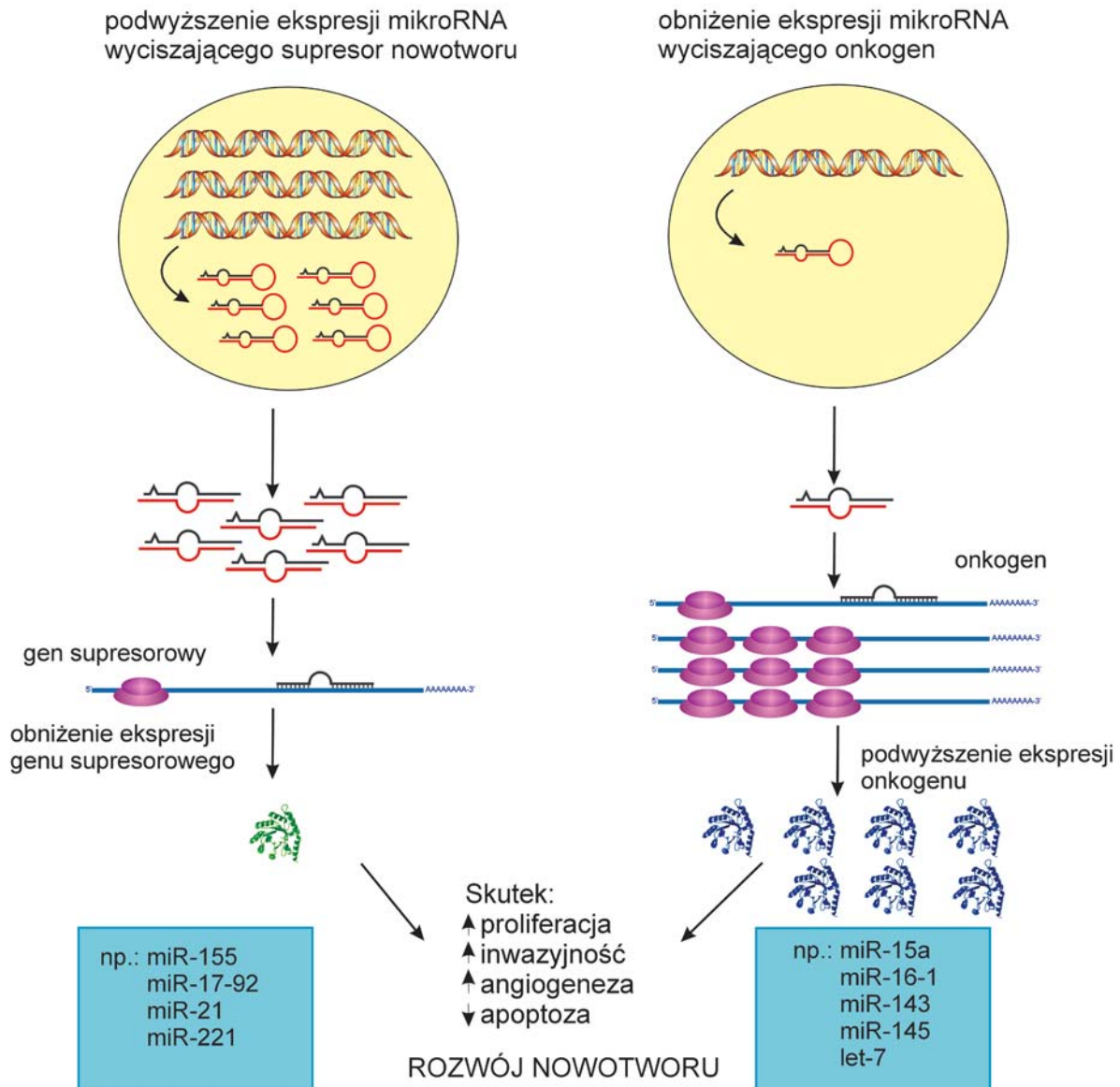
MikroRNA zaangażowane są w wiele ważnych procesów biologicznych, takich jak regulacja proliferacji, różnicowania komórek, apoptozy, embriogenezy i organogenezy [1]. Najlepiej poznanym przykładem jest mikroRNA *lin-4*. Ulega on ekspresji w pierwszym stadium larwalnym L1 nicienia *C. elegans* i inhibuje ekspresję genów *lin-14* i *lin-28*, kluczowych regulatorów wczesnych stadiów rozwojowych. U mutantów *lin-4*, zamiast różnicowania komórek, następuje powtórzenie podziałów charakterystycznych dla pierwszego stadium larwalnego [9]. U muszki owocowej *D. melanogaster* mikroRNA *bantam* odpowiedzialny jest za stymulację proliferacji i represję apoptozy poprzez inhibicję ekspresji proapop-

totycznego genu *hid*. Podwyższona ekspresja mikroRNA ban-tam powoduje przerost skrzydeł i oczu, podczas gdy skutkiem utraty jego funkcji jest powstawanie osobników o zredukowanej liczbie komórek [10]. Inny mikroRNA, miR-1, pełni ważną rolę w rozwoju mięśnia sercowego u myszy. Obiektem regulacji miR-1 jest mRNA czynnika transkrypcyjnego Hand2, który reguluje wzrost serca we wczesnych stadiach rozwoju. Ponieważ poziom tego mRNA nie zmienia się, miR-1 ulegając ekspresji w późnych stadiach rozwoju serca hamuje syntezę

białka Hand2. Utrzymuje w ten sposób równowagę między różnicowaniem komórek serca a ich podziałami [11].

### Powiązanie mikroRNA z patogenezą chorób nowotworowych

Coraz bardziej widoczna rola mikroRNA w regulacji procesów proliferacji, różnicowania komórek i apoptozy skierowała uwagę badaczy na związek mikroRNA z procesami nowotworowymi. Jakkolwiek środowisko onkologów amerykańskich



**Ryc. 2.** MikroRNA jako onkogeny i supresory nowotworów. Podwyższenie poziomu ekspresji mikroRNA może nastąpić m.in. w wyniku amplifikacji *locus* kodującego gen mikroRNA. Jeśli molekularnym celem mikroRNA o podwyższonej ekspresji jest mRNA supresora nowotworu, skutkiem będzie obniżenie ekspresji supresora nowotworu, a tym samym wzrost proliferacji i nasilenie procesów transformacji nowotworowej. Podobny efekt może być spowodowany obniżeniem poziomu ekspresji mikroRNA wyciszającego onkogen, co spowoduje podwyższenie poziomu ekspresji onkogenu. Obniżenie ekspresji mikroRNA może nastąpić m.in. w wyniku delecji lub metylacji *locus* kodującego gen mikroRNA.

**Fig. 2.** MicroRNAs as oncogenes and tumour suppressors. Left: increased expression of microRNAs, for instance, by amplification of the microRNA locus, could decrease expression of the target such as a tumour suppressor gene. Right: decreased expression of microRNAs, for instance, by deletion or methylation of the microRNA locus, could result in increased expression of a target such as an oncogene. In both cases cell transformation is favoured.

zainteresowało się tym związkiem dość późno, intensywne badania prowadzone w ostatnich latach wykazały już wiele przykładów zaburzeń regulacji mikroRNA w nowotworach. Okazało się, że mikroRNA mogą nie tylko regulować ekspresję licznych onkogenów i genów supresorowych, ale też same mogą działać jak onkogeny i supresory. MikroRNA, których geny zlokalizowane są w regionach ulegających delecji lub wyciszeniu ekspresji w różnych typach nowotworów mogą dawać efekt onkogenny, jeśli obiektem ich regulacji są mRNA onkogenów (ryc. 2). Z drugiej strony, mikroRNA których geny są zlokalizowane w regionach ulegających amplifikacji lub podwyższonej ekspresji w nowotworach, mogą powodować efekt onkogenny, jeśli wyciszają ekspresję genu supresorowego [12].

Jako supresory nowotworów mogą funkcjonować mikroRNA o aktywności proapoptotycznej, hamujące proliferację, wykazujące obniżoną ekspresję w komórkach nowotworowych. Pierwsze informacje dotyczące związku mikroRNA z nowotworami pochodzą z prac Carlo Croce, który od lat poszukiwał genu supresorowego związanego z przewlekłą białaczką limfatyczną (*chronic lymphocytic leukemia*, CLL). Poszukiwał genu kodującego białko, znajdującego się w regionie 13q14, jednak nie był w stanie go znaleźć. Kiedy odkryto pierwsze geny mikroRNA skierował na nie uwagę i odnalazł rzeczywisty obiekt swoich poszukiwań – geny dwóch mikroRNA: miR-15a oraz miR-16-1 [13]. Delecję regionu 13q14.3, w którym zlokalizowane są geny tych mikroRNA, obserwuje się u 50% pacjentów z przewlekłą białaczką limfatyczną B-komórkową (B-cell *chronic lymphoid leukemia*, B-CLL) [13], w 50% przypadków chłoniaka z komórek płaszczka (*mantle-cell lymphoma*) [14], w 30% przypadków szpiczaka mnogiego (*multiple myeloma*) [15] oraz 70% przypadków raka prostaty [16]. Cechą charakterystyczną transformowanych komórek w przewlekłej białaczce limfatycznej jest nadekspresja antyapoptotycznego białka Bcl2 (*B-cell lymphoma 2*). Widoczna jest odwrotna korelacja pomiędzy ekspresją genu *Bcl2*, a ekspresją genów *miR-15a* i *miR16-1* – podwyższona ekspresja *Bcl2* powodowana jest obniżeniem ekspresji *miR-15a* i *miR-16-1*, co potwierdza, iż te dwa mikroRNA są negatywnymi regulatorami mRNA Bcl2 [17].

Kolejnym przykładem tego typu korelacji jest rodzina mikroRNA let-7, do której należą mikroRNA wysoce zachowawcze u *C. elegans*, *D. melanogaster* oraz kręgowców. U człowieka molekularnym celem mikroRNA z tej rodziny są mRNA białek Ras, będących przekaźnikami sygnałów w komórkach. Mutacje genu *Ras* obserwowane są w 15–30% ludzkich nowotworów. W 3' UTR mRNA trzech ludzkich onkogenów *Ras* (*K-Ras*, *H-Ras* i *N-Ras*) występują sekwencje komplementarne do mikroRNA let-7. U pacjentów z rakiem płuc wykazano odwrotną korelację pomiędzy poziomem białka Ras (ale nie mRNA Ras), a poziomem ekspresji mikroRNA let-7. Obniżona ekspresja let-7 w nowotworowych liniach komórkowych jest powiązana z podwyższeniem ekspresji Ras, w porównaniu z komórkami normalnymi [18].

Inną kategorią są mikroRNA o aktywności przeciwapoptotycznej, stymulujące proliferację, ulegające podwyższonej ekspresji w komórkach nowotworowych, indukujące onkogenezę. Najlepiej zbadanym przykładem jest policistron *miR-17-92*, zawierający geny siedmiu mikroRNA: miR-17-5p, miR-17-3p, miR-18, miR-19a, miR-20, miR-19b-1 i miR-92-1, zlo-

kalizowany w chromosomie 13q31. Amplifikacja tego regionu DNA widoczna jest m.in. w przypadkach rozlanego chłoniaka z dużych komórek B (*diffuse large B-cell lymphoma*, DLBCL), chłoniaka grudkowego (*follicular lymphoma*), chłoniaka z komórek płaszczka oraz pierwotnego chłoniaka skóry B-komórkowego (*primary cutaneous B-cell lymphoma*) [19]. Analizy ekspresji mikroRNA z użyciem mikromacierzy wykazały, że podwyższona ekspresja zespołu genów *miR-17-92* indukowana jest przez podwyższoną ekspresję czynnika transkrypcyjnego c-Myc, wykazującego zaburzenia ekspresji w licznych typach nowotworów. Czynniki te wiąże się bezpośrednio do locus kodującego te mikroRNA, aktywując ich transkrypcję [20]. Na modelu chłoniaka u myszy wykazano, że podwyższona ekspresja onkogeny c-Myc powiązana z podwyższoną ekspresją zespołu genów *miR-17-92* powoduje, w stosunku do nadekspresji samego c-Myc, zwiększenie stopnia złośliwości nowotworu poprzez wzrost częstości podziałów mitotycznych oraz inhibicję apoptozy. Co ciekawe, gdy poszczególne mikroRNA, należące do tej grupy ulegały koekspresji z c-Myc, żaden nie powodował przyspieszenia rozwoju choroby, co sugeruje, że efekt onkogenny wymaga kooperatywnego działania powyższych mikroRNA [21]. Obiektem regulacji c-Myc jest też gen białka E2F1, należącego do rodziny czynników transkrypcyjnych regulujących przejście z fazy G<sub>1</sub> do fazy S cyklu komórkowego u ssaków [22]. c-Myc indukuje transkrypcję genów z rodziny E2F, natomiast ekspresja c-Myc jest indukowana przez aktywność E2F. Ekspresja E2F1 jest również regulowana przez dwa mikroRNA – miR-17-5 i miR-20a. W obecności Myc te dwa mikroRNA obniżają ekspresję E2F1, co zapewnia mechanizm tłumienia wzajemnej aktywacji Myc/E2F, umożliwiając precyzyjną regulację proliferacji [20]. W tym kontekście zespół genów *miR-17-92* funkcjonuje jako supresor nowotworu. Niedawno amplifikacja zespołu genów *miR-17-92* oraz podwyższona ekspresja tych mikroRNA została zaobserwowana w komórkach raka płuc, gdzie powoduje wzrost proliferacji [23].

Kolejnym przykładem mikroRNA, wykazującego podwyższoną ekspresję w komórkach nowotworowych, jest miR-155, którego gen zlokalizowany jest w regionie kodującym RNA BIC. W komórkach różnych typów chłoniaka obserwuje się podwyższoną ekspresję miR-155. Skoro mikroRNA powodują represję translacji, podwyższona ekspresja miR-155 sugeruje, że może on być inhibitorem ekspresji supresora nowotworu. Potencjalnym celem regulacji dla miR-155 jest mRNA czynnika transkrypcyjnego PU.1, wymagającego do różnicowania komórek B [24]. Również w 3' UTR mRNA innego czynnika transkrypcyjnego, biorącego udział w regulacji rozwoju komórek B, C/EBP $\beta$ , znajdują się potencjalne miejsca wiązania miR-155 [25]. Postuluje się również, że miR-155 może funkcjonować jako onkogen, współdziałając z c-Myc oraz obniżać ekspresję antagonistów Myc, takich jak Mad1, Mxi1 lub Rox/Mnt [26].

### Rola mikroRNA w diagnostyce i prognostyce nowotworów

Ogromny potencjał mikroRNA w diagnostyce nowotworów wynika z dużej informatywności profili ich ekspresji, którą ukazały m.in. analizy ekspresji ponad 200 mikroRNA w różnych ludzkich tkankach i typach nowotworów [27]. Za-



obserwowano wyraźną korelację pomiędzy wzorami ekspresji mikroRNA, a typami nowotworów oraz stadiami ich rozwoju [27]. Jak wynika z przedstawianej pracy [27], relatywnie niewielka liczba mikroRNA niesie większą ilość informacji diagnostycznej niż znacznie większa liczba mRNA. Wzory ekspresji zaledwie 217 mikroRNA definiują typy raka znacznie dokładniej, niż wzory ekspresji 16 000 mRNA. Analiza ekspresji mikroRNA może być także wykorzystana do identyfikacji typów nowotworów o podłożu trudnym do sklasyfikowania metodami histologicznymi [27]. Grupowanie hierarchiczne badanych próbek tkankowych wg profili ekspresji mikroRNA doprowadziło do ich wyraźnego pogrupowania, odzwierciedlającego pochodzenie tkanek. Tkaniki pochodzenia nabłonkowego były zgrupowane, tworząc pojedynczą gałąź dendrogramu, podczas gdy na innej gałęzi znajdowały się głównie próby reprezentujące nowotwory układu krwiotwórczego. Wśród prób pochodzenia nabłonkowego wyraźnie wyodrębnione były te, pochodzące z układu trawienno m.in. okrężnicy, wątroby, trzustki czy żołądka, co odzwierciedla ich wspólne pochodzenie endodermalne. Co więcej, grupowanie hierarchiczne ujawniło, że dla nowotworów o tym samym pochodzeniu tkankowym (szpik kostny) obserwowane są różne wzory ekspresji mikroRNA, odzwierciedlające różne mechanizmy transformacji nowotworowej. Nowotwory powstałe w wyniku zmian w określonych genach (grupach genów), zgrupowały się na oddzielnych gałęziach dendrogramu. Jest to zgodne z tezą, że wzory ekspresji mikroRNA obrazują historię rozwoju nowotworu, czego nie obserwuje się tak wyraźnie w przypadku profili ekspresji mRNA. Obserwacja, że mikroRNA wykazują generalne obniżenie poziomu ekspresji w porównaniu z normalnymi tkankami, wspiera tezę, że globalna ekspresja mikroRNA odzwierciedla stopień zróżnicowania komórek [27]. Zmiany poziomu ekspresji mikroRNA mogą być bardzo znaczące (tab. 1).

**Tabela 1.** Przykłady mikroRNA o obniżonej lub podwyższonej ekspresji w nowotworach

**Table 1.** Examples of microRNAs upregulated or downregulated in cancer

Typ nowotworu	MikroRNA	Ekspresja	Literatura
BCLL	miR-155	↑	28
	miR-15a miR-16-1	↓	13
	miR-17-92	↑	21
glejak	miR-21	↑	35
nowotwory płuc	miR-155	↑	31
	miR-17-92	↑	23
	let-7	↓	32
rak jelita grubego	miR-143	↓	28
	miR-145	↓	28
rak piersi	miR-21	↑	36
	miR-125b-1	↓	36
	miR-125b-2	↓	36
	miR-145	↓	36
	miR-10b	↓	36
dzięcięcy chłoniak Burkitta	miR-155	↑	26
chłoniak Hodgkina	miR-155	↑	26

W komórkach różnych typów chłoniaka w tym DLBCL wykazano od 10- do 30-krotnie większą liczbę kopii miR-155 w porównaniu z normalnymi komórkami (np. ~2000-10 000 kopii/komórkę w złośliwym DLBCL w porównaniu z liczbą ~150 kopii/komórkę w komórkach normalnych) [29]. Podwyższona ekspresja RNA BIC jest widoczna w komórkach chłoniaka Hodgkina, natomiast w komórkach dziecięcego chłoniaka Burkitta obserwowane jest nawet stukrotne zwiększenie poziomu prekursora miR-155 [26]. Tak znaczne zmiany ekspresji dają możliwość wykorzystania miR-155 w diagnostyce molekularnej tych nowotworów [29].

Profile ekspresji mikroRNA nie są jeszcze wykorzystywane jako niezależna metoda identyfikacji typów klinicznych raka piersi, definiowanych przez zwiększoną ekspresję białek ErbB2 i/lub receptora estrogenu (ER). Zastosowano je jednak w celu przetestowania zdolności mikroRNA do odróżniania tkanek zdrowych i transformowanych w raku prostaty oraz klasyfikacji nowotworów piersi definiowanych przez status ErbB2 i ER [30]. Profile ekspresji mikroRNA pochodzące z biopsji zarówno w przypadku nowotworów prostaty, jak i piersi spełniły te oczekiwania. Wykazano, iż określone grupy mikroRNA związane są z typami nowotworów definiowanymi przez status ErbB2 (let-7f, let-7g, miR-107, miR-106, miR-126, miR-154, miR-195) lub status ER/PR (miR-142-5p, miR-200a, miR-205, miR-25). Co więcej, poziomy ekspresji mikroRNA wydają się być skorelowane z cechami histopatologicznymi nowotworów piersi oraz prostaty, wielkością guza, zajmowaniem węzłów chłonnych, zdolnością do proliferacji i inwazyjnością naczyń. Sprawia to, że mikroRNA mogą stanowić nową bardzo informatywną klasę markerów molekularnych w diagnostyce oraz prognostyce nowotworów [30].

Na możliwość wykorzystania mikroRNA w prognostyce wskazuje korelacja pomiędzy profilami ich ekspresji a przeżywalnością pacjentów. Wykazano m.in. związek pomiędzy poziomem ekspresji ośmiu mikroRNA i przeżywalnością pacjentów z gruczolakorakiem płuc [31]. Pacjenci z podwyższoną ekspresją miR-155, miR-17-3p, miR-106a, miR-93 lub miR-21 bądź obniżoną ekspresją miR-7a-2, miR-7b lub miR-145 wykazywali znacznie mniejszą przeżywalność. Co więcej, analizy przeżywalności u 41 pacjentów w pierwszym stadium choroby wykazały związek poziomu ekspresji trzech mikroRNA miR-155, miR-17-3p, miR-20 z rokowaniami pacjentów [31]. Również regulacja genów *Ras* przez let-7 stała się obiektem badań klinicznych. W 60% nowotworowych linii komórkowych oraz u 44% pacjentów z nowotworem płuc wykazano obniżenie ekspresji let-7 o ponad 80% w porównaniu z tkanką normalną. Wykazano, że wysoki poziom ekspresji let-7 w komórkach nowotworowych redukuje ich zdolność do tworzenia kolonii, a tym samym wpływa hamująco na wzrost guza. Badania te przedstawiają rolę let-7 w prognostyce, gdyż rokowania pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuc (*non-small-cell lung carcinoma*) o obniżonej ekspresji let-7 były gorsze i wykazywali oni zmniejszoną przeżywalność pooperacyjną [32]. Diagnostyka molekularna nowotworów z wykorzystaniem mikroRNA ma jeszcze dodatkową zaletę natury technicznej. Większa stabilność mikroRNA w porównaniu z mRNA pozwala na bardziej precyzyjne mierzenie ich poziomu w utrwalonych w formalinie skrawkach, pobranych od pacjentów [27].

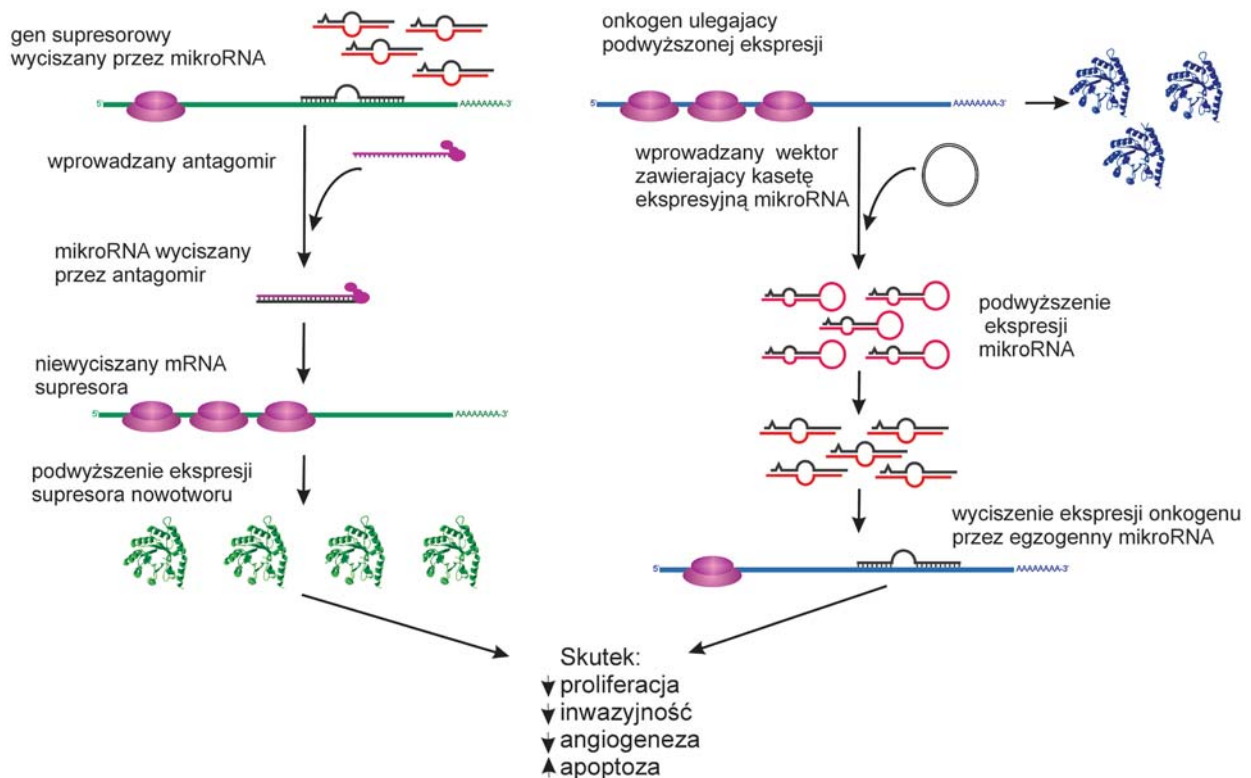
### Związek mikroRNA z nowotworami dziedzicznymi

Zaczyna się również uwidaczniać związek mutacji w genach mikroRNA z nowotworami dziedzicznymi. Dla wielu typów nowotworów tylko część przypadków ich agregacji rodzinnej można było wytłumaczyć predysponującymi mutacjami w znanych genach. Przykładem może być tu CLL, gdzie u 10–20% pacjentów obserwuje się rodzinną agregację zachorowań. Niedawno wykryte mutacje dziedziczne pri-miR-15a/16-1 u pacjentów z agregacją CLL i rakiem piersi sugerują możliwość wystąpienia efektu predyspozycji [33]. Również zmiany polimorficzne w genach mikroRNA mogą być przyczyną upośledzenia procesu biogenezy lub funkcji mikroRNA i również ten aspekt zaczyna być obecnie intensywnie badany. Dziedziczne mutacje i pozornie neutralne polimorfizmy mikroRNA mogą być zatem jednym z niepoznanych dotąd mechanizmów predysponujących do wystąpienia rodzinnej agregacji nowotworów. Jednak, aby potwierdzić tę hipotezę, konieczne są dalsze szeroko zakrojone szczegółowe analizy zmian mikroRNA w dużych grupach pacjentów, u których występują nowotwory dziedziczne. Analizy ludzkiego miRNomu, czyli całkowitej puli mikroRNA w komórce, w celu poszukiwania zaburzeń zlokalizowanych w pre-miRNA i pri-miRNA wykazały dużą częstość mutacji w tych relatywnie niewielkich

regionach. Nadchodzi zatem era badań defektów w genach mikroRNA w tej grupie nowotworów [33].

### Potencjalna rola mikroRNA w terapii

Obiecująco przedstawia się również perspektywa zastosowania mikroRNA w terapii nowotworów. Wykazano m.in., że inhibicja mikroRNA może prowadzić *in vitro* do obniżenia proliferacji komórek nowotworowych. Mutacje typu knockdown mikroRNA miR-125b prowadziły do ograniczenia proliferacji komórek w liniach komórkowych PC-3 (rak prostaty) oraz HeLa (rak szyjki macicy) [34]. Wiedza na temat mechanizmu działania miR-15a i miR-16-1 jako naturalnych inhibitorów Bcl2 ukazuje możliwość wykorzystania mikroRNA w terapii. Represja translacji mRNA Bcl2 przez powyższe mikroRNA indukuje apoptozę w chorobowo zmienionych komórkach, co może być wykorzystywane w terapii nowotworów, cechujących się nadekspresją Bcl2 [17]. MiR-21, to mikroRNA o działaniu przeciwapoptotycznym, którego podwyższona ekspresja jest obserwowana m.in. w przypadkach glejaka. Skutkiem inhibicji miR-21 w komórkach glejaka, z użyciem antysensownych oligonukleotydów jest aktywacja kaspaz i nasilenie się apoptozy. Uzyskane wyniki sugerują, że zaburzenia ekspresji miR-21 mogą



**Ryc. 3.** MikroRNA w terapii nowotworów. Celem terapii mogą być mikroRNA ulegające zarówno podwyższonej, jak i obniżonej ekspresji w nowotworach. Oligonukleotydy komplementarne do dojrzałych mikroRNA (np. antagomiry) mogą powodować ich inhibicję. Skutkiem wprowadzenia takich cząsteczek do tkanek nowotworowych będzie przywrócenie ekspresji wyciszanego wcześniej supresora nowotworu. Obniżenie ekspresji mikroRNA w nowotworach może być kompensowane poprzez wprowadzenie specjalnie zaprojektowanych wektorów zawierających kasyety ekspresyjne mikroRNA. Podwyższenie ekspresji mikroRNA spowoduje wyciszenie onkogeny, a tym samym obniżenie proliferacji i wzrost apoptozy

**Fig. 3.** MicroRNAs in therapy of cancer. Both overexpressed and underexpressed microRNAs could be therapeutic targets. Left: oligonucleotides (antagomirs) complementary to up-regulated mature microRNA will inhibit their function and activity of tumour suppressor gene will increase. Right: deficiency of microRNA in cancer cells may be compensated by their delivery from exogenous vectors. Enhanced microRNA expression will cause oncogene silencing and inhibit cell transformation

powodować użłośliwienie guzów poprzez wyciszenie ekspresji kluczowych genów proapoptotycznych [35]. Podwyższona ekspresja genu *miR-21* jest widoczna również w raku piersi, co wskazuje, że ten mikroRNA może ulegać aktywacji w różnych typach nowotworów [36].

Wyniki powyższych badań wskazują, że istnieje możliwość ograniczenia wzrostu komórek nowotworowych poprzez regulację poziomu mikroRNA (ryc. 3.).

Podwyższenie lub obniżenie poziomu mikroRNA może zostać osiągnięte na kilka sposobów. Wykazano, że funkcję endogennych mikroRNA pełnić mogą również syntetyczne oligorybonukleotydy lub prekursorzy mikroRNA, wprowadzane do komórek w specjalnie zaprojektowanych w tym celu wektorach. W przypadkach, kiedy mikroRNA wykazują podwyższoną ekspresję w chorych tkankach i wyciszają ekspresję genów supresorowych, ich poziom może być obniżony z użyciem odpowiednio przygotowanych antysensowych oligonukleotydów. Niedawno opisano użycie tzw. antagomirów, które są oligonukleotydami komplementarnymi do dojrzałych mikroRNA i powodują ich inaktywację [37]. Systemowe dostarczenie antagomirów do organizmu myszy powodowało specyficzne wyciszenie miR-122, co skutkowało podwyższeniem ekspresji licznych genów, wyciszanych wcześniej przez ten mikroRNA [38].

### Podsumowanie i perspektywy

Mimo że mikroRNA są relatywnie nowym odkryciem, już dziś naukowcy wiążą z nimi ogromne nadzieje. Mogą się one okazać kluczem do zinterpretowania wielu niezrozumiałych dotąd zjawisk biologicznych, w tym niektórych aspektów patogenezy chorób nowotworowych. Chociaż zidentyfikowano już bardzo liczne mikroRNA, dla wielu z nich nadal nieznaną są mRNA będące obiektem ich regulacji, a tym samym ich szczegółowa funkcja biologiczna. Bogatym źródłem informacji na temat funkcji ludzkich mikroRNA będą już wkrótce obserwacje efektów fenotypowych, powodowanych przez eliminację funkcji poszczególnych mikroRNA w organizmie myszy. Możliwość wykorzystania mikroRNA w diagnostyce nowotworów wydaje się coraz bardziej realna ze względu na intensywny rozwój badań z użyciem specjalnie zaprojektowanych mikromacierzy i innych technik analitycznych. Perspektywa wykorzystania mikroRNA w terapii nowotworów jest nieco bardziej odległa, lecz również realna, gdyż metody transfekcji komórek oparte na zastosowaniu wektorów mikroRNA, wcześniej niezauważonych bądź ignorowanych, są obecnie najbardziej dynamicznie rozwijającą się dziedziną biologii molekularnej, która przyniesie już wkrótce ogromne korzyści lekarzom onkologom, a przede wszystkim pacjentom.

### Piśmiennictwo

- Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 2004; 116: 281-97.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeim K, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004; 23: 4051-60.
- Gregory RI, Yan K, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 2004; 432: 235-40.
- Kim VN. MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol* 2004; 14: 156-9.
- Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. Single Processing Center Models for Human Dicer and Bacterial RNase III. *Cell* 2004; 118: 57-68.
- Tang G. siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends Biochem Sci* 2005; 30: 106-14.
- Pillai RS. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA* 2005; 11: 1753-61.
- Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ and Parker R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat. Cell Biol* 2005; 7: 719-23.
- Pasquelli AE and Ruvkun G. Control of developmental timing by microRNAs and their targets. *Cell Dev Biol* 2002; 18: 495-513.
- Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB and Cohen SM. *bantam* encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell* 2003; 113: 25-36.
- Bruneau BG. Developmental biology: tiny brakes for a growing heart. *Nature* 2005; 436: 181-2.
- Chen CZ. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *N Engl J Med* 2005; 353: 1768-71.
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 15524-9.
- Stilgenbauer S, Nickolenko J, Wilhelm J et al. Expressed sequences as candidates for a novel tumor suppressor gene at band 13q14 in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma. *Oncogene* 1998; 16: 1891-7.
- Elnenaei MO, Hamoudi RA, Swansbury J, Gruszka-Westwood AM, Brito-Babapulle V, Matutes E, Catovsky D. Delineation of the minimal region of loss at 13q14 in multiple myeloma. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 36: 99-106.
- Dong JT, Boyd JC, Frierson HF Jr. Loss of heterozygosity at 13q14 and 13q21 in high grade, high stage prostate cancer. *Prostate* 2001; 49: 166-71.
- Cimmino A, Calin GA, Fabbri M et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 13944-9. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 2464.
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 2005; 120: 635-47.
- 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.
- O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 2005; 435: 839-43.
- He L, Thomson JM, Hemann MT, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005; 435: 828-33.
- Trimarchi JM, Lees JA. Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 11-20.
- Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, et al. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res* 2005; 65: 9628-32.
- John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human MicroRNA targets. *PLoS Biol* 2004; 2: e363. Erratum in: *PLoS Biol* 2005; 3:e264.
- Xie X, Lu J, Kulbokas EJ, Golub TR, Mootha V, Lindblad-Toh K, Lander ES, Kellis M. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature* 2005; 434: 338-45.
- Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 39: 167-9.
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435: 834-8.
- Michael MZ, O'Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 2003; 1: 882-91.

29. Eis PS, Tam W, Sun L, Chadburn A, Li Z, Gomez MF, Lund E, Dahlberg JE. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 3627-32.
30. Mattie MD, Benz CC, Bowers J, et al. Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. *Mol Cancer* 2006; 5: 24.
31. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 2006; 9: 189-98.
32. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 2004; 64: 3753-6.
33. Calin GA, Croce CM. MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale. *Cancer Res* 2006; 66: 7390-4.
34. Lee YS, Dutta A. MicroRNAs: small but potent oncogenes or tumor suppressors. *Curr Opin Investig Drugs* 2006; 7: 560-4.
35. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 2005; 65: 6029-33.
36. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 7065-70.
37. Mattes J, Yang M, Foster PS. Regulation of MicroRNA by Antagomirs: A New Class of Pharmacological Antagonists for the Specific Regulation of Gene Function? *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006.
38. Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 2005; 438: 685-9.

#### Adres do korespondencji

prof. dr hab. **Włodzimierz J. Krzyżosiak**  
Instytut Chemii Bioorganicznej  
Polska Akademia Nauk  
ul. Noskowskiego 12/14  
61-704 Poznań  
tel. +48 61 852 85 03  
faks +48 61 852 05 32