

## Maciej Kupczyk, Piotr Kuna

Klinika Chorób Wewnętrznych, Astmy i Alergii Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego nr 1 im. N. Barlickiego w Łodzi, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Kierownik: prof. dr hab. n. med. P. Kuna

# MicroRNAs — nowe biomarkery chorób dróg oddechowych

## MicroRNAs — new biomarkers of respiratory tract diseases

Praca nie była finansowana

### Abstract

MicroRNAs (miRNAs) represent a group of small, non-coding RNA molecules that have been shown to regulate gene expression at the translational level by interfering with the 3' untranslated region of messenger RNAs. Gene silencing through miRNA interference is one epigenetic mechanism impacting the development and homeostasis of the organism. MiRNAs are critical for regulation of several biological processes, cellular function, the cell cycle, differentiation and apoptosis. Deregulation of miRNAs was confirmed in several pathologies including cancer (in lung cancer among others), asthma, COPD, diabetes and cardiovascular diseases. In mice models of asthma it has been found that increased levels of miR-21 and miR-126, and decreased levels of miR-672 and miR-143 are associated with regulation of cytokines involved in inflammation and remodeling, namely IL-13, IL-12, IL-10 and matrix metalloproteinase-12 (MMP-12). In lung cancer, overexpression of several miRNAs (miR-155, miR21, miR-17-92, miR221/222) and downregulation of let-7, miR-1, miR-29 and miR-126 has been found. It has been shown that serum miRNA profile may be regarded as a potential tool for early, non-invasive lung cancer diagnosis, and it can be used for chemotherapy sensitivity prediction and prognosis. MiRNAs seem to represent a promising goal in the search for new biomarkers and may be considered as an interesting target for therapeutical intervention.

**Pneumonol. Alergol. Pol. 2014; 82: 183–190**

**Key words:** microRNA, epigenetics, biomarkers, lung cancer, bronchial asthma

### Streszczenie

MicroRNAs (miRNAs) to krótkie, niekodujące cząsteczki RNA zdolne do posttranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów. Łącząc się z regionem 3'-UTR matrycowego RNA (mRNA) miRNAs powodują zahamowanie translacji lub nasilenie degradacji mRNA. MicroRNAs, obok metylacji DNA, modyfikacji histonów, zależnej od ATP przebudowy chromatyny, należą do podstawowych epigenetycznych mechanizmów regulujących ekspresję genów. Cząsteczki te odgrywają istotną rolę w utrzymaniu homeostazy organizmu, wpływają na cykl komórkowy, różnicowanie, apoptozę i inne fizjologiczne funkcje komórek. Zmiany w typowym, charakterystycznym wzorze miRNAs (wzrost lub zahamowanie ekspresji poszczególnych miRNA) zaobserwowano w wielu jednostkach chorobowych, w tym w nowotworach (m.in. raku płuca), astmie, przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc, cukrzycy i chorobie wieńcowej. Na modelach zwierzęcych astmy oskrzelowej wykazano, że podwyższona ekspresja miR-21, miR126 i obniżona miR-672 oraz miR143 są ściśle powiązane z regulacją wielu cytokin związanych z zapaleniem i remodelingiem (IL-13, IL-12, IL-10 i metaloproteinazą MMP-12). W przypadku nowotworów płuca stwierdzono nadmierną ekspresję szeregu miRNAs (miR-155, miR21, miR-17-92, miR221/222) i zahamowanie ekspresji innych miRNAs (let-7, miR-1, miR-29, miR-126) w surowicy pacjentów. Wykazano, że specyficzny wzór ekspresji miRNAs korelował z typem histologicznym guza, chemiowrażliwością i prognozą dotyczącą czasu przeżycia. MicroRNAs wydają się stanowić obiecujący cel w poszukiwaniu biomarkerów chorób układu oddechowego. Potencjalna interwencja terapeutyczna z uwzględnieniem roli microRNAs w nowotworach, chorobach układu oddechowego i innych chorobach przewlekłych wymaga dalszych badań.

**Pneumonol. Alergol. Pol. 2014; 82: 183–190**

**Słowa kluczowe:** microRNA, epigenetyka, biomarkery, nowotwór płuc, astma oskrzelowa

**Adres do korespondencji:** dr n. med. Maciej Kupczyk, Klinika Chorób Wewnętrznych, Astmy i Alergii USK nr 1 im. N. Barlickiego w Łodzi, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Kopcińskiego 22, 90–153 Łódź, tel./faks: 48 42 677 69 51, e-mail: matiska@wp.pl

DOI: 10.5603/PIAP.2014.0024

Praca wpłynęła do Redakcji: 15.03.2012 r.

Copyright © 2014 PTChP

ISSN 0867–7077

## Wstęp

MicroRNAs (miRNAs) to krótkie, niekodujące cząsteczki RNA zdolne do posttranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów. Łącząc się z regionem 3'-UTR matrycowego RNA (mRNA) miRNAs powodują zahamowanie translacji lub nasilenie degradacji mRNA. Dotychczas u ludzi zidentyfikowano ponad 700 miRNAs, każdy z nich zdolny do kontroli działania wielu różnych genów. Uważa się, że ponad 50% ludzkiego genomu regulowane jest na etapie translacji właśnie poprzez miRNAs. Z tego powodu miRNAs odgrywają istotną rolę w utrzymaniu homeostazy organizmu, wpływają na cykl komórkowy, różnicowanie, apoptozę i inne fizjologiczne funkcje komórek. MicroRNAs, obok metylacji DNA, modyfikacji histonów, zależnej od ATP przebudowy chromatyny, należą do podstawowych epigenetycznych zjawisk regulujących ekspresję genów. W pewnym uproszczeniu mówiąc, procesy epigenetyczne, poprzez zahamowanie lub nasilenie niektórych z etapów transkrypcji lub translacji, prowadzą do zmiany stopnia ekspresji materiału genetycznego. Wydaje się, że jest to jedno z kluczowych zjawisk, poprzez które szeroko pojęte bodźce środowiskowe (dieta, infekcje, zanieczyszczenie środowiska, palenie tytoniu) mogą wpływać na ekspresję genomu bez bezpośredniej modyfikacji sekwencji kodu genetycznego (bez mutacji) [1, 2]. Zmiany w typowym, charakterystycznym wzorze miRNA (wzrost lub zahamowanie ekspresji poszczególnych miRNA) zaobserwowano w wielu jednostkach chorobowych, w tym w nowotworach, cukrzycy i chorobie wieńcowej [2, 3].

MicroRNAs należą do niekodujących RNA. Niekodujące RNA (w tym interferujące RNA i micro RNA [miRNAs]), to małe (20–30 par zasad) cząsteczki RNA, kodowane przez własny gen lub przez introny lub exony innych genów. MicroRNAs syntetyzowane są w jądrze komórkowym do postaci pierwotnych miRNAs (pri-miRNA), które pod wpływem RNazy III (enzym Drosha) przechodzą w postać ~70 nt pre-miRNAs. W cytoplazmie kolejna RNaza (Dicer) docina miRNAs do postaci dojrzałej ~22nt miRNAs. Dojrzałe miRNAs łączą się z kompleksem białkowym tworząc miRISCs (microRNAs induced silencing complex). Kompleksy te mają zdolność wiązania się z matrycowym RNA w regionie 3'UTR (miRNA: mRNA) degradując go i hamując jego zdolność do transkrypcji [4–6]. Pojawiły się również doniesienia, że miRNA są zdolne do aktywacji niektórych genów [2]. Obecnie wiadomo, że jeden typ miRNA może regulować wiele mRNA i jednocześnie jeden

mRNA może być regulowany przez różne miRNAs. Wykazano, że regulacja poprzez miRNAs może mieć istotne znaczenie w rozwoju wielu nowotworów, w tym raka płuca, białaczek oraz raka jelita grubego. Wydaje się, że miRNAs może być w przyszłości wykorzystane w diagnostyce nowotworów (m.in. raka płuca, z którym korelują mi-R155, mi-R1254, mi-R126) oraz innych chorób układu oddechowego.

MiRNAs, w przeciwieństwie do RNA, dzięki powiązaniu z białkiem Ago, są bardzo stabilne i nie podlegają działaniu enzymu degradującego RNA (RNazy) [7]. MiRNAs obecne w surowicy i innych płynach ustrojowych są najprawdopodobniej produktem pozostałym po śmierci (w wyniku apoptozy lub martwicy) komórek. Wysoka stabilność, specyficzność tkankowa i ściśle zależności z patomechanizmami leżącymi u podłoża wielu chorób przewlekłych powodują, że miRNAs stanowią interesujący cel badań nad nowymi biomarkerami. Zbadanie profilu miRNAs w danej jednostce chorobowej i korelacja tego profilu z odpowiednimi genami umożliwiła poznanie nowych, nieznanych dotychczas procesów patofizjologicznych. Co ciekawe, wykazano również, że miRNAs stanowią obiecujący cel potencjalnej interwencji terapeutycznej [8]. Zastosowanie syntetycznego, stabilnego antagonisty miRNAs (antagomiru) umożliwiła regulację ekspresji genu, kluczowego dla rozwoju danej jednostki chorobowej.

## MicroRNAs w nienowotworowych chorobach układu oddechowego

### Astma oskrzelowa

Astma oskrzelowa należy do przewlekłych zapalnych chorób układu oddechowego, na którą cierpi ponad 300 milionów osób na całym świecie [9]. O ile dość dobrze można kontrolować przebieg astmy u pacjentów z łagodną i umiarkowaną postacią choroby, o tyle astma ciężka stanowi istotny problem medyczny. Pomimo wielu badań brakuje biomarkerów stopnia ciężkości astmy, dobrze korelujących z nasileniem procesów zapalnych toczących się w drogach oddechowych, objawami klinicznymi, liczbą zaostrzeń, zużyciem leków ratunkowych i odpowiedzią na leki kontrolujące, w tym glikokortykosteroidy. Być może, ciekawą alternatywę stanowią tu miRNAs. Na modelach zwierzęcych astmy oskrzelowej wykazano, że podwyższona ekspresja miR-21, miR126 i obniżona miR-672 oraz miR143 są ściśle powiązane z regulacją wielu cytokin związanych z zapaleniem i remodelingiem (IL-13, IL-12, IL-10 i metaloproteinazą MMP-12) [10]. Polike-

pahad i wsp. [11] wykazali obniżenie poziomu rodziny let-7 miRNAs w płucach w modelach eksperymentalnych astmy u myszy. Częsteczką mmu-let7a odpowiadała za regulację ekspresji Il-13 *in vitro*, a zahamowanie let 7 miRNAs *in vivo* prowadziło do istotnego ograniczenia produkcji wielu cytokin prozapalnych i rozwoju fenotypu astmy oskrzelowej. Pierwsze badania u ludzi potwierdziły te obserwacje. Wykazano korelację zmian ekspresji miRNAs z wieloma ścieżkami sygnałowymi i procesami fizjopatologicznymi, w tym z metaloproteinazami, odpowiedzią zapalną, TGF- $\beta$  (*tumor growth factor beta*) i apoptozą [10]. W badaniach kultur komórek ludzkich (nabłonka i mięśni gładkich oskrzeli) wykazano, że wiele miRNAs powiązanych jest z odpowiedzią zapalną, w tym ze stężeniami Il-1 $\beta$  (miR-146a), Il-13 (miR-133a) oraz Il-6 i Il-8 (miR-146a) [12]. Tan i wsp. [13] zidentyfikowali trzy miRNAs (miR-148a, miR-148b oraz miR-152) regulujące ekspresję genu dla antygeny HLA-G, który należy do genów wiązanych ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia astmy oskrzelowej. Williams i wsp. [14] zbadali ekspresję 227 miRNAs w biopsjach oskrzeli pacjentów z łagodną astmą oskrzelową i nie znaleźli istotnych różnic w porównaniu ze zdrową kontrolą. Warto podkreślić, że w tej pracy nie badano próbek od pacjentów z cięższymi postaciami astmy oskrzelowej, z zaawansowanym przewlekłym zapaleniem w drogach oddechowych. Solberg i wsp. [15] przeanalizowali ekspresję miRNAs w komórkach nabłonka dróg oddechowych pobranych w czasie bronchoskopii od 16 pacjentów z astmą nieleczonych dotychczas glikokortykosteroidami wziewnymi, 19 pacjentów z astmą otrzymujących standardowe leczenie i 12 zdrowych osób. Ekspresja 217 miRNAs u pacjentów nieleczonych oraz 200 miRNAs u pacjentów otrzymujących leczenie była zmieniona w porównaniu ze zdrową kontrolą. Najistotniejszy wzrost ekspresji stwierdzono dla miR-1246, miR663a oraz miR-1275, a największy spadek dla miR-34c-5p, miR-34b-5p oraz miR-141-3p. Zastosowanie wziewnych glikokortykosteroidów u pacjentów dotychczas nieleczonych wpłynęło na poziom ekspresji 9 miRNAs. Spadły poziomy miR-1246, miR-663a, miR-1275 oraz miR-92b-5p, a wzrosły let-7c, miR-24-3p, miR34a-5p, miR-34b-5p oraz miR34c-5p. Po stymulacji interleukiną 13 (Il-13) komórek nabłonka dróg oddechowych izolowanych od pacjentów z astmą obserwowano powrót do wartości prawidłowych (stwierdzanych u osób zdrowych) ekspresji 4 miRNAs z rodziny miR-34/449. Jardim i wsp. [16] przeanalizowali ekspresję miRNAs w komórkach nabłonka dróg

oddechowych pobranych od 16 pacjentów z astmą i 16 zdrowych ochotników. Zmienioną ekspresję potwierdzono dla 66 miRNAs regulujących ekspresję interleukin 8, 6 cyklooksygenazy COX-2 (*cyclooxygenase-2*) i TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor alpha*). Obserwowano istotną redukcję poziomu ekspresji miRNA-203, który reguluje gen dla aquaporyny (AQP4). Zdaniem autorów gen ten może być związany ze zwiększonym ryzykiem rozwoju astmy i może stanowić interesujący cel dalszych badań.

W pracy opublikowanej w 2013 roku Levanen i wsp. [17] przeanalizowali profil miRNAs w exosomach obecnych w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych (BALF, *bronchoalveolar-lavage fluid*) u pacjentów z astmą. Z wcześniejszych badań [18] wiadomo było, że w BALF pacjentów z astmą można wykryć exosomy, które zawierają enzymy niezbędne do syntezy leukotrienów i interleukiny 8. Exosomy to pęcherzyki wielkości około 30–100 nm wytwarzane w endosomach i stopniowo uwalniane przez komórki strukturalne i komórki biorące udział w odpowiedzi immunologicznej. Levanen i wsp. [17] wyizolowali exosomy z BALF pobranego od 10 pacjentów z astmą łagodną, 10 zdrowych osób i przeanalizowali obecność 894 miRNAs. Stwierdzono istotne różnice w ekspresji 24 miRNAs, a 16 z nich (w tym rodzina let-7 oraz miRNA-200) umożliwiły identyfikację pacjentów z astmą oskrzelową (siła predykcji 72%). Zdaniem autorów miRNAs o zmienionej ekspresji u astmatyków związane są z regulacją produkcji lub działania Il-13, 10, 8, 6 oraz ścieżek sygnałowych MAPK i JAK-STAT istotnych w patogenezie astmy oskrzelowej.

MikroRNAs stanowią interesujący cel interwencji terapeutycznej w astmie. Colison i wsp. [19] wykazali, że antagomir (częsteczką blokująca działanie danego miRNA) dla miR-126 (ant-miR-126) w istotny sposób hamuje napływ eozynofików do dróg oddechowych w zwierzęcym modelu astmy oskrzelowej. W innym modelu zapalenia dróg oddechowych indukowanego alergenem roztoczy kurzu domowego wykazano, że antagonizm miRNA-145 daje efekt przeciwzapalny zbliżony do siły działania glikokortykosteroidów [20]. Chiba i wsp. [21] obserwowali obniżony poziom miR-133a w modelu zwierzęcym astmy oskrzelowej, co wiązało się ze zwiększoną syntezą Il-13, białka RhoA (GTPazy regulującej funkcję mięśni) oraz zwiększoną nadreaktywnością dróg oddechowych. Podobnie, zastosowanie antagomiru dla miR-133a, prowadziło do wzrostu produkcji RhoA i wystąpienia nadreaktywności dróg oddechowych.

## Przewlekła obturacyjna choroba płuc

Analizując poziom ekspresji 484 miRNAs w płucach gryzoni eksponowanych na dym tytoniowy wykazano, że 126 miRNAs było w istotny sposób (co najmniej 2-krotnie) obniżonych [22]. Potwierdza to założenia hipotezy epigenetycznej regulacji ekspresji genotypu. Boddże ze środowiska w istotny sposób wpływają na procesy transkrypcji i translacji. Podobnie w badaniach na ludziach, wykazano, że 23 miRNAs są w istotny sposób obniżone w nabłonku dróg oddechowych palaczy w porównaniu ze zdrową kontrolą [22]. Takahasi i wsp. [23] wykazali, że w surowicy osób badanych można wykryć zmiany poziomów ekspresji miRNAs indukowane paleniem. Analizie poddano próbki pobrane od 11 palaczy i 7 osób niepalących. Stężenia 43 miRNA (w tym między innymi miR-221, let-7g, let-7e, miR-26a, miR30c) były istotnie podwyższone u osób palących. Co ciekawe, potwierdzono, że rzucenie palenia powodowało powrót profilu miRNAs do obserwowanego u osób niepalących. Autorzy wykazali również, że wyłącznie długotrwałe palenie, a nie jednorazowa ekspozycja na dym tytoniowy wpływa na profil miRNAs. Van Pottelberg i wsp. [24] zbadali ekspresję 627 miRNAs w indukowanej płwocinie pacjentów z przewlekłą obturacyjną chorobą płuc (POChP) i u palaczy. Stwierdzono, że stężenia 34 miRNAs były zmienione w porównaniu z kontrolą. Spadek ekspresji let-7c wiązał się z nadmierną ekspresją receptora II dla czynnika martwicy guza (TNFR-II), który jest zaangażowany w procesy zapalenia leżącego u podłoża patogenezy POChP. Osłabienie siły mięśniowej, spadek masy mięśni szkieletowych czy kacheksja są typowe dla POChP. Donaldson i wsp. [25] stwierdzili, że stężenia miRNAs regulujących geny odpowiedzialne za budowę i funkcję mięśni (miR-1, miR-499, miR-133 oraz miR-206) są podwyższone w surowicy pacjentów z POChP w porównaniu ze zdrową kontrolą. Soeda i wsp. [26] przeanalizowali ekspresję miRNAs w surowicy 40 pacjentów z POChP w porównaniu z 20 zdrowymi palaczami. Stężenia 9 z badanych miRNAs (miR-29b, miR-483-5p, miR-152, miR-629, miR-26b, miR101, miR106b, miR-532-5p oraz miR-133b) były istotnie obniżone. Obserwano istotną statystycznie odwrotną korelację pomiędzy poziomem miR-106b a czasem trwania choroby. Autorzy sugerują, że miR-106b może pełnić istotną rolę w patogenezie POChP, a w przyszłości może być biomarkerem stosowanym w praktyce klinicznej. Podobnie Akbas i wsp. [27] zbadali ekspresję 72 miRNAs w surowicy 20 pacjentów z POChP w porównaniu z 12 osobami zdrowymi. Stwier-

dzono obniżenie stężenia miR20a, miR-28-3p, miR-34c-5p oraz miR-100, a wzrost stężenia miR-7. Pinkerton i wsp. [28] wykazali, że miRNAs mogą zostać wykryte w kondensacie powietrza wydechowego. Porównując stężenia miRNAs u pacjentów z astmą, POChP i u zdrowych osób obserwowano obniżenie ekspresji miR-1248, miR-1291 i let7a u pacjentów z astmą w porównaniu z POChP i grupą kontrolną, obniżenie miR-328 i miR-21 zarówno u pacjentów z astmą, jak i POChP w porównaniu z kontrolą oraz obniżenie miR-133a i miR-155 u pacjentów z astmą w porównaniu z kontrolą. Analizując potencjalne znaczenie obserwowanych zmian w patogenezie chorób układu oddechowego, autorzy podkreślili, że genami docelowymi, które podlegają regulacji przez opisane miRNAs, są geny odpowiadające za produkcję i funkcję interleukin (IL)-13, 4, 5, 8, 17, 1 $\beta$ , GATA3, FCepsilon1 $\beta$ , MMP-1, receptora dla TGF- $\beta$ , TLR2, TLR4 oraz CCL22.

## Samoistne włóknienie płuc

Samoistne włóknienie płuc (IPF, *idiopathic pulmonary fibrosis*) jest przewlekłą chorobą układu oddechowego cechującą się akumulacją miofibroblastów i odkładaniem kolagenu. Większość badań nad genetycznym uwarunkowaniem tej choroby skupiało się na czynnikach sprzyjających aktywacji fibroblastów. Obserwowano zwiększoną syntezę metaloproteinazy 7 (MMP-7), a w modelu zwierzęcym włóknienia płuc indukowanego bleomycyną myszy *knock-out* dla MMP-7 (MMP-7<sup>-/-</sup>) były chronione przed rozwojem zmian w drogach oddechowych. W kolejnych pracach potwierdzono istotną rolę czynnika wzrostu TGF- $\beta$ 1 i nadmiernej angiogenezy. Analizując potencjalne mechanizmy epigenetyczne stwierdzono zahamowanie ekspresji miRNA let 7d w drogach oddechowych pacjentów z IPF. Dokładniejsze badania tych mechanizmów wykazały, że let7d wiąże się z cząsteczką smad3, która pośredniczy w transmisji sygnału receptora dla TGF- $\beta$ . W badaniach *in vivo* na modelach mysich zahamowanie let7d prowadziło do nadmiernego odkładania kolagenu w drogach oddechowych [29]. Liu i wsp. [30] wykazali nadmierną ekspresję miR-21 w drogach oddechowych pacjentów z IPF. Podobnie w badaniach *in vitro* fibroblasty stymulowane TGF- $\beta$  charakteryzowały się wzrostem ekspresji miR-21. Blokowanie miR-21 swoistym antagomirem hamowało włóknienie płuc indukowane bleomycyną u myszy.

## Sarkoidoza

W jednej z pierwszych prac dotyczących potencjalnej roli miRNAs w sarkoidozie Crouser

i wsp. [31] przeanalizowali wzór miRNAs w materiale pobranym z płuca, węzłów chłonnych i w limfocytach krwi obwodowej pacjentów z rozpoznaną sarkoidozą w porównaniu z osobami zdrowymi. Poziomy ekspresji miR20a oraz miR302c były obniżone w płucach a zwiększone w węzłach chłonnych, a poziomy miR92b i miR206 były zwiększone zarówno w płucach, jak i węzłach chłonnych badanych pacjentów w porównaniu z kontrolą. Wzór ekspresji miRNA w limfocytach krwi obwodowej chorych na sarkoidozę był istotnie różny od zdrowej kontroli. Co ciekawe zmiany w ekspresji miRNA obserwowane w płucach i węzłach chłonnych (na przykład dotyczące miR92b oraz miR206) nie miały swojego odbicia w profilu miRNAs w limfocytach krwi obwodowej. Autorzy pracy podkreślają, że obserwowane zmiany u chorych dotyczą miRNAs regulujących ekspresję TGF- $\beta$ , co może mieć bezpośredni związek z patogenezą choroby, gdyż cytokina ta hamuje procesy włóknienia oraz reguluje funkcję limfocytów T, a podwyższone stężenia TGF- $\beta$  obserwowano w ziarniniakach gruczołowych i w przebiegu sarkoidozy.

Wydaje się, że wyniki badań dotyczących roli miRNAs na modelach zwierzęcych chorób układu oddechowego są bardzo obiecujące. Wyniki pierwszych obserwacji u ludzi wydają się to potwierdzać, choć niezbędne są dalsze prace kliniczne na dobrze zcharakteryzowanych grupach pacjentów. Szczególnie uderzające jest to, że pomimo zastosowania podobnych kryteriów włączenia do badania, w wielu przedstawionych powyżej pracach, opisywane profile zmian miRNAs są istotnie różne. Brakuje badań opisujących powiązania miRNAs ze stopniem ciężkości choroby, parametrami fizjologicznymi (wydolnością układu oddechowego), czasem trwania choroby i odpowiedzią na leczenie. Dalszych analiz wymaga zbadanie roli miRNAs w sarkoidozie, POChP i innych chorobach układu oddechowego. Bez wątplenia kolejne badania umożliwiłyby lepsze zrozumienie procesów patologicznych toczących się w drogach oddechowych pacjentów, poznanie kluczowych elementów zachodzących zjawisk, być może znalezienie nowych biomarkerów i w efekcie zastosowanie nowej, skuteczniejszej i bezpieczniejszej interwencji terapeutycznej.

### **MicroRNAs w raku płuca i innych nowotworach**

Dysregulacja na poziomie miRNAs wydaje się mieć istotne znaczenie w wielu procesach patofizjologicznych, w tym w rozwoju nowotworów. W badaniach nad zjawiskami nowotworzenia

wykazano, że rozwój guza, progresja choroby, przerzuty zależne są od genów regulowanych przez miRNAs. W jednej z pierwszych prac nad tym zagadnieniem Calin i wsp. [32] potwierdzili, że wiele miRNA zlokalizowanych jest w regionach genomu, które są usuwane lub ulegają amplifikacji w trakcie rozwoju różnych typów nowotworów. MiRNAs wpływają na procesy apoptozy, kontrolują wiele onkogenów i czynników wzrostu. Przykładem jest let-7, hamujący wzrost guza w modelach zwierzęcych [33]. Wiele miRNAs promuje proliferację komórek nowotworowych (miR-17-92, miR-221/222 oraz miR-21), inne wpływają na procesy apoptozy i przeżycie komórek (miR-15a oraz miR-16-1), angiogenezę (miR-424 oraz miR-107), a także modulują zdolność do inwazji tkanek (rodzina miR-200, miR-103/107). Coraz więcej szczegółowych prac doświadczalnych potwierdza, że rozwój guza, jego progresja i zdolność do przerzutowania jest regulowana przez liczne miRNAs [33].

W przypadku nowotworów płuca zaobserwowano nadmierną ekspresję szeregu miRNAs (miR-155, miR-21, miR-17-92, miR-221/222) i zahamowanie ekspresji innych miRNAs (let-7, miR-1, miR-29, miR-126) w surowicy pacjentów. Wykazano, że specyficzny wzór ekspresji miRNAs korelował z typem histologicznym guza i umożliwiał różnicowanie pomiędzy adenocarcinoma i rakiem drobnokomórkowym [34]. Co istotne ekspresja niektórych miRNA korelowała z istotnymi parametrami klinicznymi, takimi jak lekowrażliwość, prognoza dotycząca progresji choroby oraz czasu przeżycia [35]. Ponadto potwierdzono, że charakterystyczny profil miRNA w surowicy krwi pacjentów, może być czułym i swoistym testem do wykrycia wczesnych, przedinwazyjnych postaci raka płuca, a dodatkowo może pomóc w określeniu chemiowrażliwości guza [36–38]. Markou i wsp. [39] przeanalizowali profil ekspresji miRNAs w niedrobnokomórkowym raku płuca (NSCL, *non small cell lung cancer*). Badając miRNAs w utkaniu nowotworowym, stwierdzono wzrost stężenia miR-21, miR-126, miR-30d, miR30e-5p i spadek stężenia miR-451 w porównaniu ze zdrową kontrolą. W próbkach surowicy pacjentów z rozpoznaniem NSCL trzy miRNAs (miR-21, miR-10a i miR30e-5p) wykazywały ekspresję istotnie różną w porównaniu z kontrolą. Wysokie stężenia miR-21 w surowicy i utkaniu nowotworowym korelowały z dłuższym okresem remisji i dłuższym czasem przeżycia. Niska ekspresja miR-10a i wysoka miR-30e-5p w surowicy związane były z krótszym okresem remisji i krótszym czasem przeżycia. Autorzy

sugerują, że opisane miRNAs powinny być dalej badane jako potencjalne nieinwazyjne biomarkery NSLC. Sanfiorenzo i wsp. [40] zbadali 17 miRNAs związanych we wcześniejszych pracach z rakiem płuca w surowicy 52 pacjentów z chorobą nowotworową, 10 pacjentów z PChP i u 20 osób z grupy kontrolnej. Panel 11 miRNAs umożliwił identyfikację pacjentów z rozpoznaniem NSLC w porównaniu z osobami zdrowymi (czułość 81,1%, swoistość 82,9%, pole pod krzywą ROC 0,879). Panel 6 miRNAs umożliwił różnicowanie NSLC w porównaniu z PChP (czułość 90,9%, swoistość 83,3%, pole pod krzywą ROC 0,944). Wysoki poziom miR-155-5p, miR-223-3p oraz niski poziom miR-126-3p związany był z wysokim ryzykiem progresji choroby u pacjentów z rozpoznaniem gruczolakorakiem. Panel kolejnych 3 miRNAs (miR-20a-5p, miR-152-3p oraz miR-199a-5p) korelował z przeżyciem pacjentów z rozpoznaniem rakiem drobnokomórkowym płuca. W pracy Rani i wsp. [41] przeanalizowano 667 miRNAs w surowicy 80 pacjentów z gruczolakorakiem (stadia 1–4) i 40 zdrowych osób stanowiących kontrolę. Sześć miRNAs (miR-30c-1, miR-616, miR-146b-3p, miR-566, miR-550 oraz miR-93) miało zdecydowanie wyższą ekspresję, a dwa (miR-339-5p oraz miR-656) niższą u pacjentów z chorobą nowotworową. Xu i wsp. [42] wykazali, że podwyższona ekspresja miR-9 wiąże się z wyższym ryzykiem występowania przerzutów ( $p < 0,001$ ), rozmiarami guza pierwotnego ( $p < 0,013$ ), występowaniem wczesnych przerzutów do węzłów chłonnych ( $p = 0,001$ ), gorszą prognozą i krótszym czasem przeżycia ( $p < 0,001$ ).

W dalszych pracach badano związek ekspresji poszczególnych miRNAs z odpowiedzią na leczenie w raku płuca. Zhang i wsp. [43] stwierdzili, że miR-155, miR-10a, miR-30a, miR-24-2\* i miR-30c-2\* ulegały zwiększonej ekspresji w liniach komórkowych NSLC wrażliwych na gemcytabinę, a miR-200c, miR-203, miR-885-5p, miR-195 i miR-25\* miały wyższe stężenia w liniach komórkowych niewrażliwych na ten chemioterapeutyk. Wiążąc te obserwacje z patofizjologią choroby, autorzy stwierdzili, że w liniach komórkowych wrażliwych na gemcytabinę wzrosła ekspresja genów związanych z adhezją komórek (NRP2, CXCR3, CDK5R1, IL32 oraz CDH2), produkcją pęcherzyków wydzielniczych (SLC11A1, GP5, CD36 i IGF1), a w liniach komórkowych niewrażliwych — genów związanych z metylacją histonów (HIST1H2BF, RAB23 i TP53) i oksydoreduktazą (TP53I3, CYP27B1 i SOD3). W innym badaniu miR-495 związany był z lepszą odpowiedzią na leczenie cisplatyną [44].

Obserwacje te mają bardzo duże znaczenie praktyczne, gdyż obecnie nie ma dobrych metod wczesnej diagnostyki raka płuca. Można mieć nadzieję, że w ciągu najbliższych lat oznaczanie microRNA wejdzie do codziennej praktyki medycznej jako nowe skuteczne narzędzie diagnostyczne. Jednym z potencjalnych ograniczeń tej metody są stosunkowo wysokie koszty oznaczeń. Jednak, tak jak w przypadku innych nowych metod diagnostycznych i terapeutycznych, po potwierdzeniu klinicznej wartości nowej metody, stopniowo opracowywane są tańsze i bardziej dostępne testy, które mogą być stosowane na szeroką skalę.

Podobnie istotne zmiany w ekspresji miRNAs wykazano w przypadku raka piersi, trzustki, prostaty, jelita grubego i w białaczkach [33]. Pierwsze badania pilotażowe sugerują, że miRNA mogą być klinicznie istotnymi biomarkerami w diagnostyce raka jelita grubego [45] i raka prostaty [46]. MiRNAs stanowią obiecujący cel badań również w nowotworach głowy i szyi [47]. W badaniu Hui i wsp. [48] 38 z analizowanych 117 miRNAs wykrytych w próbkach tkankowych nowotworów głowy i szyi charakteryzowało się odmienną ekspresją w porównaniu ze zdrową kontrolą. Wykazano nadmierną ekspresję miR-21, miR-155, let-7i oraz miR-142-3p oraz obniżoną ekspresję miR-125b i miR-375. Niezbędne są kolejne badania nad korelacją charakterystycznego wzoru miRNAs z parametrami klinicznymi, typem histologicznym guza i rokowaniem.

MicroRNAs stanowią również interesujący cel ewentualnej interwencji terapeutycznej. Możliwe jest wprowadzenie egzogennej miRNA do komórek za pomocą przejściowej lub stałej transfekcji lub transdukcji z użyciem wirusów. W pracach na modelach zwierzęcych wykazano, że podanie do guza egzogennej let-7 prowadzi do zahamowania wzrostu nowotworu [49]. Podobnie, podanie miR-26a w mysim modelu nowotworu wątroby prowadzi do regresji guza [50]. Alternatywną metodą jest podanie swoistych inhibitorów (antagomirów) poszczególnych miRNAs. Zastosowanie syntetycznych antagomirów okazało się skuteczne w zahamowaniu angiogenezy w modelach nowotworów jajnika i piersi. Wydaje się, że cząsteczki te mogą stanowić bardzo ciekawą, nową grupę leków [8].

### MicroRNAs w innych chorobach

Zaburzenia na poziomie miRNAs stanowią istotny element patomechanizmów wielu chorób o podłożu zapalnym, w tym chorób układu krążenia

nia, neurologicznych, reumatycznych, cukrzycy i sepsy. Stężenie wielu swoistych miRNAs (miR-1, miR-133a, miR-133b oraz miR-499-5p) rośnie w ostrym zawale serca [2], a ekspresja miR-103, miR-142-3p, miR-30b, i miR-342-3p umożliwia różnicowanie niewydolności krążenia i POCHP [51]. Specyficzny wzór miRNAs jest również charakterystyczny dla zapalenia jelit i choroby Crohna [52]. W cukrzycy spada stężenie miR-15a, miR-29b, miR-126, miR-223, a wzrasta miR-28-3p. MiR-126 jest wiązany z mikroangiopatiami w przebiegu cukrzycy, a miR-9 koreluje z poziomem uwalniania insuliny po stymulacji glukozą [2].

Podsumowując, microRNAs należą do kluczowych cząsteczek regulujących transkrypcję i translację materiału genetycznego. Zgodnie z hipotezą epigenetyczną szereg bodźców środowiskowych może, poprzez miRNAs, wpływać na fenotyp organizmu. Poznanie zjawisk regulacji miRNAs umożliwia zrozumienie patomechanizmów wielu chorób przewlekłych i nowotworów. Charakterystyczny profil zmian w poziomach ekspresji miRNAs może być pomocny we wczesnej diagnostyce. Rola miRNAs jako biomarkerów nie jest jeszcze jasna. Większość przedstawionych powyżej prac to badania wstępne i doświadczalne, w małych grupach pacjentów, które nie spełniają kryteriów analiz walidacyjnych. Bez wątplenia w najbliższych latach prowadzonych będzie wiele kolejnych badań poświęconych temu zagadnieniu. MicroRNAs stanowią również obiecujący cel potencjalnej interwencji terapeutycznej. Być może w niedługiej przyszłości analiza miRNAs będzie istotnym etapem diagnostyki i wstępem do leczenia zgodnego z endotypem danej jednostki chorobowej w ramach medycyny personalizowanej [53].

### Konflikt interesów

Autorzy nie deklarują konfliktu interesów.

### Piśmiennictwo:

- Kupczyk M., Kuna P. Epigenetyka astmy oskrzelowej. *Terapia* 2011; 4: 65–69.
- Ciesla M., Skrzypek K., Kozakowska M. i wsp. MicroRNAs as biomarkers of disease onset. *Annal. Bioanal. Chem.* 2011; 410: 2051–2061.
- Nakajima M., Yokoi T. MicroRNAs from biology to future pharmacotherapy: regulation of cytochrome P450s and nuclear receptors. *Pharmacology and Therapeutics* 2011; 131: 330–337.
- Maes T., Tournoy K.G., Joos G.F. Gene therapy for allergic airway diseases. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2011; 11: 163–172.
- Williams A.E., Larner-Svensson H., Perry M.M. i wsp. MicroRNA expression profiling in mild asthmatic human airways and effect of corticosteroid therapy. *PLoS ONE* 2011; 4: e5889. Doi: 10.1371/journal.pone.0005889.
- Persson H., Kvist A., Rego N. i wsp. Identification of new microRNAs in paired normal and tumor breast tissues suggests a dual role for the ERBB2/Her2 gene. *Cancer Res.* 2011; 71: 78–86.
- Turchonovich A., Weiz L., Langheinz A., Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39: 7223–7233.
- Mattes J., Yang M., Foster P.S. Regulation of microRNA by antagomirs: a new class of pharmacological antagonists for the specific regulation of gene function? *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2007; 36: 8–12.
- Busse W.W. Difficult-to-treat asthma: how serious is the problem and what are the issues? *Eur. Respir. Mon.* 2011; 51: 1–15.
- Jiang X. The emerging role of microRNAs in asthma. *Mol. Cell. Biochem.* 2011; 353: 35–40.
- Polikepahad S., Knight J.M., Naghavi A.O. i wsp. Proinflammatory role for let-7a microRNAs in experimental asthma. *J. Biol. Chem.* 2010; 285: 30139–30149.
- Garbacki N., Di Valentin E., Huynh-Thu V.A. i wsp. MicroRNAs profiling in murine models of acute and chronic asthma: a relationship with mRNAs targets. *PLoS ONE* 2011; 6: e16509.
- Tan Z., Randall G., Fan J. i wsp. Allelespecific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma. *Am. J. Hum. Genet.* 2007; 81: 829–834.
- Williams A.E., Larner-Svensson H., Perry M.M. i wsp. MicroRNA expression profiling in mild asthmatic human airways and effect of corticosteroid therapy. *PLoS ONE* 2011; 4: e5889. Doi: 10.1371/journal.pone.0005889.
- Solberg O.D., Ostrin E.J., Love M.I. i wsp. Airway epithelial miRNA expression is altered in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012; 186: 965–974.
- Jardim M.J., Dailey L., Silbajoris R. i wsp. Distinct microRNA expression in human airway cells of asthmatic donors identifies a novel asthma-associated gene. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2012; 47: 536–542.
- Levanen B., Bhakta N.R., Paredes P.T. i wsp. Altered microRNA profiles in bronchoalveolar fluid exosomes in asthmatic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013; 131: 894–903.
- Paredes P.T., Esser J., Admyre C. i wsp. Bronchoalveolar lavage fluid exosomes contribute to cytokine and leukotriene production in allergic asthma. *Allergy* 2012; 67: 911–919.
- Collison A., Herbert C., Siegle J.S. i wsp. Altered expression of microRNA in the airway wall in chronic asthma: miR-126 as a potential therapeutic target. *BMC Pulmonary Medicine* 2011; 11: 29.
- Collison A., Mattes J., Plank M. i wsp. Inhibition of house dust mite-induced allergic airways disease by antagonism of microRNA-145 is comparable to glucocorticoid treatment. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011; 128: 160–167.
- Chiba Y., Misawa M. MicroRNAs and their therapeutic potential for human diseases: miR-133a and bronchial smooth muscle hyperresponsiveness in asthma. *J. Pharmacol. Sci.* 2010; 114: 264–268.
- Oglesby I.K., McElvaney N., Greene C.M. MicroRNAs in inflammatory lung disease —master regulators or target practice? *Respiratory Research* 2010; 11: 148.
- Takahashi K., Yokota S., Tatsumi N. i wsp. Cigarette smoking substantially alters plasma microRNA profiles in healthy subjects. *Toxicol. Applied Pharmacology* 2013; 272: 154–160.
- Van Pottelberge G.R., Mestdagh P., Bracke K.R. i wsp. MicroRNA expression in induced sputum of smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011; 183: 898–906.
- Donaldson A., Nataneek S.A., Lewis A. i wsp. Increased skeletal muscle-specific microRNA in the blood of patients with COPD. *Thorax* 2013; published on line 28.06.2013 doi: 10.1136
- Soeda S., Ohyashiki J.H., Ohtsuki K. i wsp. Clinical relevance of plasma miR-106b levels in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Int. J. Mol. Medicine* 2013; 31: 533–539.
- Akbas F., Coskunpinar E., Aynaci E. i wsp. Analysis of serum micro-RNA as potential biomarker in chronic obstructive pulmonary disease. *Exp. Lung Res.* 2012; 38: 286–294.
- Pinkerton M., Chinchilli V., Banta E. i wsp. Differential expression of microRNAs in exhaled breath condensates of patients with asthma, patients with chronic obstructive pulmonary

- disease, and healthy adults. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013; 132: 217–219.
29. Kass D.J., Kaminski N. Evolving genomic approaches to idiopathic pulmonary fibrosis: moving beyond genes. *Clin. Transl. Sci.* 2011; 4: 372–379.
  30. Liu G, Friggeri A, Yang Y i wsp. miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *J Exp Med* 2010; 207: 1589–1597.
  31. Crouser E.D., Julian M.W., Crawford M. i wsp. Differential expression of micro RNA and predicted targets in pulmonary sarcoidosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012; 417: 886–891.
  32. Calin G.A., Sevignani C., Dumitru C.D. i wsp. Human microRNAs genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101: 2999–3004.
  33. Nana-Sinkam S.P., Croce C.M. MicroRNAs as therapeutic targets in cancer. *Transl. Res.* 2011; 157: 216–225.
  34. Landi M.T., Zhao Y., Rotunno M. i wsp. MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer. *Cancer Cell* 2008; 13: 48–57.
  35. Voortman J., Goto A., Mendiboure J. i wsp. MicroRNA expression and clinical outcomes in patients treated with adjuvant chemotherapy after complete resection of non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res.* 2010; 70: 8288–8298.
  36. Keller A., Leidinger P., Gislefoss R. i wsp. Stable serum miRNA profiles as potential tool for non-invasive lung cancer diagnosis. *RNA Biol.* 2011; 8: 506–516.
  37. Chen X., Hu Z., Wang W. i wsp. Identification of ten serum microRNAs from a genome-wide serum microRNA expression profile as novel non-invasive biomarkers for non-small cell lung cancer diagnosis. *Int. J. Cancer* 2011; 130: 1620–1628.
  38. Skrzypski M., Dziadziuszko R., Jassem J. MicroRNA in lung cancer diagnostics and treatment. *Mutat. Res.* 2011; 717: 25–31.
  39. Markou A., Sourvinou I., Vorkas P.A. i wsp. Clinical evaluation of microRNA expression profiling in non small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2013; 81: 388–396.
  40. Sanfiorenzo C., Ilie M.I., Belaid A. i wsp. Two panels of plasma microRNAs as non-invasive biomarkers for prediction of recurrence in resectable NSCLC. *PLoS ONE* 2013; 8: e54596.
  41. Rani S., Gately K., Crown J. i wsp. Global analysis of serum microRNAs as potential biomarkers for lung adenocarcinoma. *Cancer Biol. Ther.* 2013; 14: Epub ahead of print.
  42. Xu T., Liu X., Han L. i wsp. Up-regulation of miR-9 expression as a poor prognostic biomarker in patients with non-small cell lung cancer. *Clin. Transl. Oncol.* 2013 Sep 10 Epub ahead of print.
  43. Zhang H.H., Zhang Z.Y., Che C.L. i wsp. Array analysis for potential biomarker of gemcitabine identification in non-small cell lung cancer cell lines. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2013; 6: 1734–1746.
  44. Song L., Li Y., Wu S. i wsp. MiR-495 enhances the sensitivity of non-small cell lung cancer cells to platinum by modulation of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase A (ATP7A). *J. Cell Biochem.* 2013; Sep 5 doi: 10.1002, Epub ahead of print.
  45. Luo X., Burwinkel B., Tao S., Brenner H. MicroRNA signatures: new biomarker for colorectal cancer? *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2011; 20: 1272–1286.
  46. Mahn R., Haukamp L.C., Rogenhofer S. i wsp. Circulating microRNAs (miRNA) in serum of patients with prostate cancer. *Urology* 2011; 77: 1265.e9–1265.e16.
  47. Babu J.M., Prathibha R., Jijith V.S. i wsp. A miR-centric view of head and neck cancers. *Biochim. Biophys. Acta* 2011; 1816: 67–72.
  48. Hui A.B., Lenarduzzi M., Krushel T. i wsp. Comprehensive MicroRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 2010; 16: 1129–1139.
  49. Trang P., Medina P.P., Wiggins J.F. i wsp. Regression of murine lung tumors by the let-7 microRNA. *Oncogene* 2010; 29: 1580–1587.
  50. Broderick J.A., Zamore P.D. MicroRNA therapeutic. *Gene Therapy* 2011; 18: 1104–1110.
  51. Ellis K.L., Cameron V.A., Troughton R.W. i wsp. Circulating microRNAs as candidate markers to distinguish heart failure in breathless patients. *Eur. J. Heart Fail.* 2013; doi: 10.1093, Epub ahead of print.
  52. Dalal S.R., Kwon J.H. The role of microRNA in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Hepatol.* 2010; 6: 714–722.
  53. Auffrey C., Adcock I.M., Chung K.F. i wsp. An integrative systems biology approach to understanding pulmonary diseases. *Chest* 2010; 137: 1410–1416.