

Jubileusz 60-lecia krakowskiego Centrum Onkologii

W dniach 2 i 3 czerwca 2011 r. krakowski Oddział Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie obchodził jubileusz 60-lecia działalności. W ramach uroczystości zaplanowano okolicznościową konferencję naukową, która odbyła się w czwartek, 2 czerwca, w zabytkowych wnętrzach Pałacu Larischa, kilkaset metrów od Rynku Głównego, w historycznym centrum Krakowa.

Program konferencji obejmował wykłady przygotowane przez przedstawicieli jednostek krakowskiego Oddziału, między innymi Klinik: Chirurgii Onkologicznej, Ginekologii Onkologicznej, Nowotworów Piersi i Klatki Piersiowej, Nowotworów Głowy i Szyi, Nowotworów Układowych i Uogólnionych oraz Zakładów: Fizyki Medycznej, Analityki Medycznej, Diagnostyki Obrazowej i innych.

W drugiej części konferencji wykłady przedstawili znakomici reprezentanci zarówno krakowskich, jak i odległych od Małopolski klinik i oddziałów współpracujących z Centrum Onkologii, w tym urzędujący prezesi towarzystw naukowych, m.in. prof. Wojciech Polkowski (Polskie Towarzystwo Chirurgii Onkologicznej), prof. Marek Sosnowski (Polskie Towarzystwo Urologiczne). Należy także podkreślić, że wśród wykładców i przewodniczących poszczególnych sesji nie brakowało kon-

sultantów krajowych w pokrewnych onkologii dziedzinach (m.in. prof. Andrzej Borówka, prof. Krzysztof Herman, prof. Jan Kulig, prof. Jan Kulpa, prof. Michał Waliński). W konferencji naukowej uczestniczyło kilkuset lekarzy i pracowników systemu ochrony zdrowia – przede wszystkim z Małopolski, ale także z bardziej odległych od Krakowa ośrodków.

Zasadnicze uroczystości Jubileuszu 60-lecia krakowskiego oddziału Centrum Onkologii rozpoczęły się w piątek, 3 czerwca, poranną Mszą Świętą odprawioną przez Jego Eminencję Księdza Kardynała Franciszka Macharskiego w kościele Świętej Anny – siedzibie duszpasterstwa krakowskich środowisk naukowych. Tego samego dnia, o godzinie 11.00 w pięknym gmachu Pałacu Wielopolskich, siedzibie Prezydenta i Rady Królewskiego Stołecznego Miasta Krakowa, rozpoczęła się uroczysta sesja, którą swoją obecnością zaszczylicili Patroni Honorowi Jubileuszu: Minister Zdrowia – dr Ewa Kopacz, Arcybiskup Metropolita Krakowski – kardynał Stanisław Dziwisz oraz reprezentant Dyrektora Centrum Onkologii – prof. Macieja Krzakowskiego. Ponadto przybyli członkowie Komitetu Honorowego obchodów 60-lecia krakowskiego Centrum Onkologii: Wojewoda Małopolski Stanisław Kracik, Kardynał Franciszek Macharski, Prezydent Miasta Krakowa Jacek Majchrowski, Wicemarsza-



Ryc. 1. Otwarcie Jubileuszowej Konferencji Naukowej w Pałacu Larischa (prof. Andrzej Stelmach – Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego)



Ryc. 2. Uroczyste obchody Jubileuszu 60-lecia krakowskiego Centrum Onkologii
(Sala obrad Rady Królewskiego Stołecznego Miasta Krakowa)



Ryc. 3. Dostojni Goście Jubileuszu: Kardynał Stanisław Dziwisz (Arcybiskup Metropolita Krakowski),
dr Ewa Kopacz (Minister Zdrowia), prof. Jacek Majchrowski (Prezydent Miasta Krakowa)



Ryc. 4. Prof. Marian Reinfuss otrzymuje z rąk Prezydenta Krakowa Jacka Majchrowskiego odznaczenie *Honoris Gratia*



Ryc. 5. Spotkanie towarzyskie w ogrodach Muzeum Archeologicznego
(w tle fasada dawnego Klasztoru Karmelitów Bosych oraz kościoła Świętego Michała [obecnie Muzeum Archeologiczne])

łek Województwa Małopolskiego Wojciech Kozak. Uroczystość swoją obecnością uświetnili także: Posłowie na Sejm RP, Dyrektor Małopolskiego Oddziału Narodowego Funduszu Zdrowia, Prorektor Uniwersytetu Jagiellońskiego ds. Collegium Medicum, dyrektorzy wielu ośrodków onkologicznych z całej Polski oraz licznych krakowskich szpitali, przedstawiciele towarzystw naukowych, w tym najstarszego krajowego towarzystwa onkologicznego – Polskiego Towarzystwa Onkologicznego.

Uroczystość rozpoczęło powitanie Gości przez Dyrektora krakowskiego Oddziału Centrum Onkologii, prof. Mariana Reinfussa. Następnie ciepłe i mądre słowa do zgromadzonych skierował Metropolita Krakowski, Kardynał Stanisław Dziwisz. Minister Zdrowia Ewa Kopacz w swoim wystąpieniu podkreśliła zmiany, jakie w ostatnim czasie zachodzą w polskiej onkologii, a następnie wspólnie z Wojewodą Małopolskim Stanisławem Kracikiem wręczyła kilkudziesięciu pracownikom Centrum Onkologii odznaczenia państwowe. Krzyże Kawalerskie Orderu Odrodzenia Polski otrzymali: prof. Bogdan Gliński, prof. Krzysztof Urbański, prof. Michał Waligórski. Złote Krzyże Zasługi otrzymali: prof. Jerzy Mituś, dr Anna Brandys, dr Edward Byrski, prof. Krzysztof Herman, dr Jerzy Jakubowicz, prof. Kazimierz Karolewski, prof. Jadwiga Rachtan, prof. Janusz Ryś, prof. Andrzej Stelmach, dr Tomasz Walasek. Złote Medale za Długoletnią Służbę otrzymali m.in.: prof. Krzysztof Duda, prof. Anna Gasińska, prof. Zbigniew Kojs, prof. Teresa Kowalska, prof. Jan Skołyszewski.

Następnie wiele życliwych słów pod adresem Centrum Onkologii skierował Prezydent Krakowa, Jacek

Majchrowski, po czym udekorował 10 pracowników Centrum odznaką *Honoris Gratia*, m.in. prof. Jana Kulpę, prof. Mariana Reinfussa (i dr Wojciecha Wysockiego – przyp. Redakcji).

Ogółem udekorowano 84 osoby.

Kolejno głos zabierali zaproszeni Goście oraz Przyjaciele krakowskiego Centrum Onkologii, składając gratulacje z okazji Jubileuszu oraz przekazując zgromadzonym życzenia odnoszące się do przyszłości tej ważnej na mapie polskiej onkologii placówki leczniczej i badawczo-rozwojowej. Uroczystość zakończył bardzo ciekawy wykład prof. Edwarda Towpika na temat historii polskiej i krakowskiej onkologii.

Zakończenie wydarzeń związanych z Jubileuszem miało miejsce 3 czerwca po południu w ogrodach Muzeum Archeologicznego, gdzie do późnego wieczoru toczyło się spotkanie towarzyskie Gości i Pracowników krakowskiego Centrum Onkologii. Ciepła, czerwcową noc, wspaniały widok na Zamek Królewski na Wawelu oraz wyśmienite jedzenie pozwalają mieć nadzieję, że wszyscy uczestnicy Jubileuszowych wydarzeń, zarówno przybyli z daleka, jak i z bliska, zachowają miłe wspomnienia.

Dr med. Wojciech M. Wysocki

Wiceprzewodniczący Komitetu Organizacyjnego Jubileuszu 60-lecia Centrum Onkologii, Oddział w Krakowie

Autorem zdjęć jest mgr Kamil Kisielewicz z Zakładu Fizyki Medycznej Centrum Onkologii, Oddział w Krakowie.

Sprawozdanie z konferencji „MicroRNA and Non-Coding RNA and Cancer”

W dniach 11-16 lutego 2011 r. w Banff, Alberta w Kanadzie odbyła się konferencja poświęcona mikroRNA i innym niekodującym RNA oraz ich roli w chorobach nowotworowych, organizowana przez Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology.

W spotkaniu wzięło udział wielu czołowych badaczy zajmujących się małymi niekodującymi RNA, w tym Carlo Croce, Currt Hurri, Scott Lowe, Joshua Mendell, Andrea Ventura, Frank Slack. Podczas konferencji sesje poświęcone były mechanizmom biogenezy i biologicznego działania mikroRNA, ich genom docelowym, polimorfizmom, działaniu onkogennemu oraz działaniu hamującemu rozwój nowotworów, mikroRNA w odpowiedzi immunologicznej, angiogenezie i przerzutowaniu, a także wykorzystaniu mikroRNA jako biomarkerów, znaczeniu mikroRNA w mechnizmach wielokierunkowego różnicowania komórek, technikom wprowadzania mikroRNA do komórek oraz terapeutycznemu zastosowaniu mikroRNA. Wykładom towarzyszyły cztery sesje plakato-

we, w czasie których przedstawiono około 230 doniesień, w tym wyniki prac prowadzonych przez Anetę Świercz, Agnieszkę Dansonkę-Mieszkowską, Magdalenę Chchlińską, Michalinę Zajdel, Alinę Rembiszewską, Jolan-tę Kupryjańczyk oraz Jana Konrada Siwickiego w ramach współpracy Zakładu Immunologii i Zakładu Patologii Molekularnej Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie. Plakat przedstawiał zagadnienia dotyczące ekspresji wybranych markerów wielokierunkowego różnicowania komórek w kontekście statusu TP53 w pierwotnym raku jajnika („Stem-cell markers and TP53 in primary ovarian cancer”).

W sprawozdaniu omówione zostaną doniesienia z badań nad rolą mikroRNA w biologii nowotworowych komórek macierzystych, rolą mikroRNA-21 w chorobach nowotworowych i leczeniu chorych na nowotwory oraz badań na temat krążących mikroRNA. Omawiane doniesienia poprzedza krótkie wprowadzenie do prezentowanej tematyki.

MikroRNA (miR) to krótkie, około 22 nukleotydowe, niekodujące RNA, które biorą udział w regulacji ekspresji genów. Pierwszy miR – lin-4 został odkryty w 1993 r., w badaniach nad rozwojem nicienia *Caenorhabditis elegans*. Związek miR z nowotworami po raz pierwszy zauważyli Croce i współpracownicy w 2002 r., stwierdzając, że obszary kodujące miR-16 i miR-15 są zlokalizowane w chromosomie 13, w regionie, który ulega delecji u ponad 65% chorych na przewlekłą białaczkę limfatyczną.

MikroRNA w biologii nowotworowych komórek macierzystych

Komórki macierzyste charakteryzują się niską aktywnością podziałową, zdolnością do samoodnowy i różnicowania, aktywnością telomerazy, aktywacją szlaków antyapoptotycznych, zwiększoną aktywnością przekaźników błonowych, zdolnością do migracji i tworzenia przerzutów oraz zdolnością do wzrostu niezależnie od przylegania do podłoża.

Obecnie uważa się, że źródłem nawrotu i rozsiewu chorób nowotworowych po leczeniu są w dużej mierze komórki wykazujące cechy właściwe komórkom macierzystym i charakteryzujące się podwyższoną opornością na klasyczne czynniki cytoredukcyjne. Komórki takie nazywa się komórkami macierzystymi nowotworu (*Cancer Stem Cells* – CSC) lub komórkami inicjującymi nowotwór (*Cancer Initiating Cells* – CIC). Duże nadzieje wiąże się z terapiami skierowanymi przeciwko tym komórkom.

Badania nad molekularnymi mechanizmami odpowiedzialnymi za zdolność komórek do wielokierunkowego różnicowania oraz możliwościami terapeutycznego wykorzystania komórek macierzystych objęły próby reprogramowania komórek zróżnicowanych do niezróżnicowanych – o cechach komórek macierzystych. Uzyskano tzw. indukowane komórki pluripotencjalne (*Induced Pluripotent Cells, iPS*), wykazujące cechy komórek macierzystych. W 2006 r. Takahashi i Yamanaka uzyskali taki efekt w mysich fibroblastach przez wymuszenie ekspresji c-Myc, Oct4, Sox2 i Klf4. W 2007 r. udało się reprogramować ludzkie fibroblasty poprzez wymuszenie ekspresji: Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc (Yamanaka i wsp.) oraz OCT4, SOX2, NANOG, LIN28 (Thomson i wsp.)

Znaczenie mikroRNA w komórkach o cechach komórek macierzystych w liniach komórkowych glejaka; Gunter Mester; University of Regensburg

Zespół Guntera Mestera prowadził badania nad profilem ekspresji mikroRNA w macierzystych komórkach glejaków. Autorzy zaobserwowali wyższą ekspresję mikroRNA-17-5p, mikroRNA-9, mikroRNA-9* i mikroRNA-106 w komórkach linii komórkowych glejaków, ujawniających na powierzchni antygen CD133+, uznany w glejakach za marker macierzystości.

Wyciszenie ekspresji mikroRNA9/9* w komórkach CD133+ zmniejszało ich zdolność do tworzenia kolonii w półpłynnym agarze, podczas gdy nadekspresja mikroRNA-9/9* sprzyjała tworzeniu kolonii. Wyciszenie mikroRNA9/9* hamowało ponadto wzrost komórek *in vivo* oraz zdolność tworzenia guzów. Po zredukowaniu ekspresji tych mikroRNA zaobserwowano zmniejszenie odsetka komórek ujawniających markery powierzchniowe, charakterystyczne dla komórek macierzystych oraz zwiększoną zdolność do różnicowania.

Po wyciszeniu ekspresji mikroRNA-9 zaobserwowano znaczący wzrost ekspresji CAMPTA1. Ekspresja CAMPTA1 jest często obniżona w glejakach niskozróżnicowanych, w porównaniu do wysokozróżnicowanych oraz zdrowej tkanki glejowej, co sugeruje potencjalną rolę CAMPTA1 w hamowaniu rozwoju nowotworów. Wykazano, że w genie CAMPTA1 znajduje się potencjalne miejsce wiązania mikroRNA-9 oraz mikroRNA-17. Nadekspresja CAMPTA1, podobnie jak zahamowanie mikroRNA9/9*, powodowała spadek liczby kolonii w półpłynnym agarze, spadek liczby komórek CD133+ oraz korelowała z wydłużonym czasem przeżycia chorych na glejaki. Ekspresja mikroRNA-9/9* nie korelowała z czasem przeżycia.

MikroRNA-34 hamuje proces reprogramowania komórek somatycznych do indukowanych komórek pluripotencjalnych; Young Jin Choi; University of California at Berkeley

Ze względu na opisywaną zależność miR-34a od TP53 i przypisywany TP53 udział w procesie reprogramowania komórek, autorzy zainteresowali się znaczeniem miR-34a w tym procesie. Zespół Young Jin Choi wykazał związek mikroRNA-34 z wydajnością reprogramowania komórek. Badacze zaobserwowali, że mysie embrionalne fibroblasty (MEF) z miR-34a/- wykazywały cechy prawidłowych komórek iPS, w tym cechy morfologiczne i wysoką ekspresję markerów typowych dla komórek pluripotencjalnych. Jednym z kluczowych genów docelowych, uczestniczących w procesie hamowania reprogramowania przez mikroRNA-34a, jest Nanog - marker późnego odróżnicowania komórek, służący utrzymaniu stanu pluripotencjalności. Ekspresja Nanog była podwyższona w komórkach iPS z mikroRNA-34a/- i obniżona w komórkach z nadekspresją mikroRNA-34a.

Rola p53 w reprogramowaniu komórek macierzystych; Varda Rotter; Weizmann Institute of Science

Zespół Vardy Rotter od wielu lat zajmuje się badaniem genu TP53. W ostatnim czasie badacze zainteresowali się znaczeniem TP53 w procesie reprogramowania i w funkcjonowaniu *in vivo* komórek iPS.

W mysich embrjonalnych fibroblastach (MEF) o różnym statusie TP53 – prawidłowy TP53 (WT TP53), zmutowany TP53 (MT TP53), wyciszona ekspresja TP53 (KD

TP53) oraz brak TP53 (KO TP53) – wymuszano ekspresję Oct4, Sox2 i/lub Klf4. Komórki udało się reprogramować do iPS, niezależnie od statusu TP53. Wyraźne różnice ujawniały się jednak w wydajności procesu reprogramowania i, o ile w warunkach *in vitro* komórki reprogramowane nie różniły się, *in vivo*, w zależności od statusu TP53, komórki wykazywały różne własności. Reprogramowane komórki MT TP53 oraz komórki KO TP53, oprócz typowych cech komórek macierzystych, wykazywały cechy nowotworowych komórek macierzystych i po wstrzyknięciu myszom zarówno różnicowały, jak i prowadziły do rozwoju guzów złośliwych, jednak komórki MT TP53 charakteryzowały się większym niż KO TP53 potencjałem onkogenym. Komórki z WT TP53 i KD TP53 jedynie sporadycznie prowadziły do rozwoju nowotworów. Reprogramowanie komórek KO TP53 przy pomocy tylko dwóch czynników: Oct4 i Sox2 powodowało utrzymanie cech iPS *in vivo*, zaś w komórkach MT TP53 ujawniało nowe funkcje TP53, przejawiające się większą wydajnością procesu reprogramowania, ograniczoną zdolnością różnicowania *in vivo* oraz wzmocnieniem cech charakterystycznych dla komórek niezróżnicowanych.

Indukowane komórki pluripotencjalne uzyskiwały zdolność różnicowania w tkanki wywodzące się ze wszystkich trzech listków zarodkowych, jednak niezależnie od statusu TP53 wykazywały również potencjał tworzenia nowotworów złośliwych. Zdolność ta w najmniejszym stopniu ujawniała się w komórkach z prawidłowym TP53, co może świadczyć o udziale prawidłowego TP53 w ochronie indukowanych komórek pluripotencjalnych przed transformacją do nowotworowych komórek macierzystych. Uzyskane wyniki nakazują ostrożność w zwiększaniu wydajności procesu reprogramowania poprzez wyciszenie TP53.

mikroRNA-29b, mikroRNA-125a regulują ekspresję podoplaniny i hamują inwazyjność glejaków; Maria A. Cortez; The University of Texas M.D. Anderson Cancer Center

Celem badań Marii Cortez była identyfikacja mikroRNA regulujących ekspresję podoplaniny (PDPN) – uznanego markera macierzystości w glejakach. Zespół zaobserwował wyraźnie niższy poziom miR-29b, miR-125a i miR-149 w tkance glejaka, niż w tkance prawidłowej. Ponieważ komórki CD133+ uczestniczą w inicjacji rozwoju glejaka, zbadano poziom ekspresji tych trzech mikroRNA w komórkach CD133+. Ekspresja miR-29b, miR-125a i miR-149 w komórkach CD133+ była wyraźnie niższa niż w komórkach CD133-. Wymuszenie ekspresji mikroRNA-29b i mikroRNA-125a poprzez wprowadzenie odpowiednich „*mimics*” – syntetycznych oligonukleotydów, imitujących określone mikroRNA, prowadziło do znaczącego spadku poziomu podoplaniny (PDPN). Udowodniono, że PDPN jest w sposób bezpośredni regulowana przez te mikroRNA. Wprowadzenie mikroRNA-29 i mikroRNA-125a do komórek linii LN319 i U251 powodowało znaczący spadek inwazyjno-

ści komórek. Podobne efekty uzyskano wyciszając PDPN przy pomocy siRNA. miR-29b dodatkowo indukował apoptozę w sposób zależny od TP53.

MikroRNA-21 w chorobach nowotworowych i leczeniu

Gen dla miR-21 leży na chromosomie 17q23.2. Jest silnie konserwatywny. MikroRNA-21 reguluje proliferację, migrację, inwazyjność oraz przeżycie komórek, jest niezbędny do przejścia z fazy G0 do G1. Ekspresja miR-21 jest zwiększona w wielu nowotworach i wydaje się promować wzrost komórek i zdolność przerzutowania. Podwyższona ekspresja miR-21 może być też fizjologiczną odpowiedzią na stres.

Wydaje się, że zmiany ekspresji mikroRNA-21 w nowotworach są regulowane na poziomie transkrypcyjnym i/lub potranskrypcyjnym.

Pierwsze wzmianki o zmienionej ekspresji miR-21 w nowotworach dotyczyły glejaków. Ekspresja mikroRNA-21 była podwyższona we wszystkich przypadkach glejaków o wysokim stopniu złośliwości histologicznej. Również linie komórkowe glejaka charakteryzowały się podwyższoną ekspresją mikroRNA-21. Nadekspresję mikroRNA-21 wykryto również w wielu innych nowotworach, w tym w rakach piersi, płuca, okrężnicy, gruczołu krokowego, wątroby, żołądka, jajnika, szyjki macicy, głowy i szyi, tarczycy oraz w białaczkach i chorobach innych niż nowotworowe, np. w skurczowej niewydolności serca. W nielicznych pracach odnotowano spadek ekspresji mikroRNA-21 np. w raku żołądka (w części badanych próbek) i w nerwiaku zarodkowym.

W badaniach funkcjonalnych na liniach komórkowych wielu nowotworów wykazano, że wymuszona ekspresja miR-21 powodowała wzmoczoną proliferację, migrację i inwazyjność. Przeciwnie działanie miał *knock-out* miR-21. Nieliczne prace funkcjonalne mówią o działaniu mikroRNA-21 jako genu hamowania nowotworów, np. w komórkach HeLa.

MikroRNA-21 może być również wykorzystywany jako biomarker. Wysoka ekspresja mikroRNA-21 jest złym czynnikiem rokowniczym w raku okrężnicy i niedrobnokomórkowym raku płuca.

MikroRNA-21 ma również udział w mechanizmie oporności na leki. W komórkach glejaków hamuje apoptozę zależną od TP53, indukowaną chemioterapeutykami, np. doksorubicyną. Supresja miR-21 w linii raka przewodów żółciowych powoduje wzrost wrażliwości na gemcytabinę, zaś spadek ekspresji miR-21 w linii MCF7 raka piersi – wzrost wrażliwości na topotekan. W badaniach na liniach raka piersi wykazujących ekspresję HER2 podwyższony poziom miR-21 wiązał się ze spadkiem poziomu PTEN i osłabioną reakcją na trastumuzab (Herceptin).

Genami docelowymi mikroRNA-21 są głównie pozytywne regulatory apoptozy (MARK, pDCD4), negatywne regulatory cyklu komórkowego i proliferacji (PTEN, Spry2, TPM1), migracji, inwazyjności i przerzutowania (RECK, PTEN, Maspin, TPM1).

MikroRNA-21 w zaleźnym od K-RAS rozwoju raka płuca; Mark E. Hatley i współpracownicy; University of Texas Southwestern Medical Center

Celem badaczy było poznanie roli mikroRNA-21 w rozwoju raka płuca. Badania prowadzono na modelu mysim. Nadekspresja miR-21 powodowała szybszy rozwój nowotworu, aktywację K-RAS, spadek ekspresji negatywnych regulatorów ścieżki RAS/MEK/ERK - Spry1, Spry2, Btg2, Pcd4 oraz spadek ekspresji czynników proapoptycznych, takich jak Apaf-1, Faslg, Pcd4, RhoB. Obniżona ekspresja mikroRNA-21 częściowo hamowała rozwój nowotworu i uwrażliwiała komórki na działanie chemioterapeutyków uszkadzających DNA.

MikroRNA jako nowy cel terapii w raku wątroby; Asha Balakrishnan i współpracownicy; University of California

Celem badań zespołu Asha Balakrishana było sprawdzenie terapeutycznego działania anty-miR-21 w raku wątroby. Stworzono myszy model z nadekspresją RAS/LT2 w komórkach wątroby. Myszy takie rozwijały guzy wątroby histopatologicznie i molekularnie przypominające ludzkiego raka wątroby. Ekspresja mikroRNA-21 w tym nowotworze, podobnie jak w ludzkim HCC, była podwyższona. Wyciszenie ekspresji mikroRNA-21 u tych myszy zapobiegało rozwojowi raka wątroby. 1-3-tygodniowe leczenie anty-miR-21 dawało znaczący spadek ekspresji miR-21 w wątrobie. Długotrwałe podawanie anty-miR-21 myszom RAS/LT2 znacząco wydłużało ich czas przeżycia.

MikroRNA-21 w procesie regeneracji wątroby u myszy; Raymond Ng i współpracownicy; University of California

Raymond Ng badał mechanizm działania mikroRNA-21 w procesie regeneracji komórek wątroby. W warunkach *in vivo* zaobserwował, że mikroRNA-21 promuje proliferację hepatocytów w czasie regeneracji wątroby poprzez wzmacnianie ekspresji cykliny D1. Zmiany poziomu cykliny D1 regulowane były na poziomie białka i prowadziły do opóźnionej syntezy DNA w hepatocytach. Podwyższona ekspresja miR-21 była niezbędna do uruchomienia translacji cykliny D1, hamowanej przez 4E-BP1. Inicjacja translacji odbywała się m.in. poprzez supresję RhoB, która prowadziła do aktywacji ścieżki Akt, a następnie fosforylacji i inhibicji 4E-BP1.

Związek ekspresji mikroRNA-21 w komórkach śródbłonna z własnościami angiogennymi; Celine Sabatel i współpracownicy; University of Liege

Autorzy badali znaczenie mikroRNA-21 w procesie angiogenezy. W badaniach *in vivo* nadekspresja mikroRNA-21 w komórkach śródbłonna naczyń powodowała spadek zdolności tych komórek do proliferacji i migracji oraz ograniczenie zdolności do tworzenia naczyń. Ekspresja mikroRNA-21 ograniczała również proces organizowania się włókien aktynowych, co mogło ograniczać zdolność komórek do migracji. Nadekspresja miR-21 powodowała także spadek ekspresji RhoB i ograniczenie funkcji RhoB. Wykazano, że RhoB jest genem docelowym mikroRNA-21. Wyciszenie RhoB zaburzało migrację komórek śródbłonna oraz zdolność do tworzenia naczyń. Aktywność mikroRNA-21 jako inhibitora angiogenezy potwierdzono na modelu mysim.

Krające mikroRNA

Po raz pierwszy obecność kwasów nukleinowych w surowicy i osoczu zaobserwowali Mendel i Metais w 1947 r. W 1999 r. Kopreski i współpracownicy wykryli we krwi mRNA tyrozynazy. Obecnie wiadomo, że kwasy nukleinowe, w tym mikroRNA, występują we wszystkich płynach ustrojowych.

Wydaje się, że krające mikroRNA służą komunikowaniu się komórek na odległość.

Krające mikroRNA są uwalniane zarówno przez komórki prawidłowe, jak i w stanach patologicznych. Najwięcej mikroRNA w osoczu pochodzi z komórek układu krwionośnego i chłonnego, w tym z erycytów, płytek krwi i leukocytów. Coraz więcej badań wskazuje na istnienie istotnych różnic w profilach ekspresji mikroRNA w osoczu i w surowicy, zaś za lepszy materiał do badania ekspresji krających mikroRNA uznaje się osocze, gdyż w procesie wykrzepiania może dochodzić do nieswoistego uwalniania miR.

Endogenne krające mikroRNA cechują się dużą opornością na działanie rybonukleaz. Krające mikroRNA są stabilne również w warunkach niskiego (pH=1) i wysokiego pH (pH=13) oraz podczas wielokrotnych cykli zamrożenia i rozmrażania. Mechanizmy zabezpieczania mikroRNA przed degradacją nie zostały jeszcze dokładnie poznane, mówi się jednak o ich występowaniu w kompleksach z białkami, o różnego rodzaju modyfikacjach chemicznych i zamknięciu mikroRNA w strukturach błoniastych – mikropęcherzykach, w tym w egzosomach. Występowanie egzosomów zawierających miR udowodniono w płynach biologicznych, w tym w osoczu krwi.

Ze względu na dużą stabilność mikroRNA w płynach ustrojowych oraz łatwość i niską inwazyjność pozyskiwania płynów ustrojowych, możliwość badania krających mikroRNA budzi duże nadzieje. Chodzi głównie o wykorzystywanie krających mikroRNA jako nowych potencjalnych biomarkerów diagnostycznych, rokow-

nicznych i predykcyjnych oraz służących monitorowaniu leczenia i przebiegu choroby.

Zmiany poziomu krążących mikroRNA stwierdzono u chorych na różne nowotwory. U chorych na raki płuca i jajnika stwierdzono wyraźnie więcej krążących egzosomów oraz większą ilość egzosomalnego RNA niż u osób zdrowych.

Formy zabezpieczenia krążących mikroRNA; Jason D. Arroyo i wsp.; University of Washington

Arrayo i wsp. znaleźli dwie formy zabezpieczenia i transportu krążących mikroRNA – struktury błoniaste (pęcherzyki) i kompleksy białkowe. Zaobserwowali również, że sposób transportu poszczególnych mikroRNA u osób zdrowych nie różnił się osobniczo. Około połowa mikroRNA wykrywanych w osoczu i surowicy była związana z białkami, zaś około 10% z pęcherzykami. Jednym z białek wiążących krążące mikroRNA było Argonaute2 (Ago2). Interakcje pomiędzy Ago2 a mikroRNA autorzy potwierdzili metodą immunoprecypitacji. Autorzy przypuszczają, że funkcje mikroRNA mogą zależeć od formy ich występowania w osoczu.

Profil krążących mikroRNA we wczesnej fazie niedrobnokomórkowego raka płuca; Niels H. Heegaard i wsp.; National Institute of Health, Statens Serum Institute

Heegaard z zespołem badali profil ekspresji mikroRNA w osoczu i surowicy od chorych na niezaawansowanego niedrobnokomórkowego raka płuca oraz u osób zdrowych. U chorych na nowotwory, w porównaniu z osobami zdrowymi, zaobserwowano spadek ekspresji mikroRNA-146b, mikroRNA-221, let-7a, mikroRNA-155, mikroRNA-17-5p, mikroRNA-27, mikroRNA-106a oraz wzrost ekspresji mikroRNA-29c. Uzyskane różnice nie pozwalały jednak na jednoznaczne różnicowanie kontroli i wczesnej fazy NSCLC. Zaob-

serwowano, że spadek ekspresji let-7b wiązał się z wyższym odsetkiem zgonów z powodu niedrobnokomórkowego raka płuca, zaś spadek ekspresji mikroRNA-223 z krótszym czasem przeżycia chorych w stadium IA/B. Poziom ekspresji mikroRNA w osoczu nie korelował z poziomem ekspresji mikroRNA w surowicy. Profil ekspresji mikroRNA różnił się u Amerykanów rasy białej i czarnej.

Selektywny skład mikroRNA w egzosomach z komórek raka trzustki; M. Bassel Malas i wsp.; Ruhr University Bochum

Autorzy ocenili profil ekspresji mikroRNA w komórkach raka trzustki oraz w egzosomach wydzielanych przez te komórki. Profile ekspresji okazały się różne, co wskazywało, że proces transferu mikroRNA do mikropęcherzyków jest wysoce selektywny. Ekspresja niektórych mikroRNA w egzosomach, w tym miR-24 i miR-221, była wyższa od ekspresji w komórkach, z których egzosomy są uwalniane. Ekspresja mikroRNA w egzosomach wydawała się być wysoce zależna od czynników wzrostu, obecnych w płynach hodowlanych.

Autorzy dokonali ponadto próby transferu egzosomów pochodzących z komórek nowotworowych do fibroblastów, następnie zaś stwierdzili, że profil ekspresji mRNA tych fibroblastów i fibroblastów kontrolnych jest różny. Fibroblasty „stransfeskowane” egzosomami pochodzenia nowotworowego nabywały zdolność przyciągania komórek zapalnych.

Podziękowanie

Składam serdeczne podziękowania Fundacji im. Jakuba hrabiego Potockiego za pomoc w sfinansowaniu mojego udziału w tej niezwyklej konferencji.

Aneta Świercz
Zakład Immunologii
Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie
w Warszawie