

232 Zapojení vybraných mikroRNA do patogeneze kolorektálního karcinomu a jejich korelace s klinicko-patologickými charakteristikami.

Slabý O.¹, Svoboda M.¹, Garajová I.², Svoboda M.², Šachlová M.², Šmerdová T.¹, Trtílková A.², Jurasová I.², Vyzula R.²

1) Oddělení onkologické a experimentální patologie, Masarykův onkologický ústav, Brno,

2) Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav, Brno

MikroRNA (miRNA) jsou nekódující jednořetězcové RNA o délce 18-25 nukleotidů tvořící novou skupinu regulátorů genové exprese vyskytující se v rostlinných i živočišných buňkách. Kódující mRNA negativně regulují jedním ze dvou mechanismů v závislosti na míře komplementarity miRNA s cílovou sekvencí. Při úplné či téměř úplné komplementaritě miRNA s cílovou sekvencí dochází k jevu RNA interference. Kódující mRNA jsou štěpeny ribonukleázami v multiproteinovém komplexu asociovaném s miRNA, RISC (RNA-induced silencing complex), dokud nejsou zcela degradovány. Tento mechanismus byl opakovaně pozorován v rostlinných buňkách, ale doposud nebyl prokázán u buněk živočišných. Živočišné miRNA využívají rozdílného mechanismu, který není spojený s degradací cílové mRNA. Regulační účinek uskutečňují vazbou na nedokonale komplementární sekvence v rámci 3' netranslatovaných oblastí (UTR) cílových mRNA, a expresi genů regulují post-transkripčně tím, že znemožňují jejich translaci. Druhý mechanismus je proto doprovázen souvisejícím poklesem hladiny kódovaného proteinu, zatímco hladina cílové mRNA není ovlivněna [1].

Biogeneze miRNA z prekurzorových molekul je dvoustupňový proces. Primární transkripty, pri-miRNA, jsou často dlouhé i několik kilobází a jsou dále v jádře zpracovávány RNázou III zvanou Drosha a dvouřetězcovou-RNA-vázajícím proteinem Pasha na přibližně 70 nukleotidů dlouhé pre-miRNA vytvářející nedokonalé vlásenkové struktury, které jsou exportovány do cytoplazmy transportérem exportin 5. Pre-miRNA jsou dále štěpeny RNázou III zvanou Dicer na finální miRNA duplexy dlouhé přibližně 22 bází. Jedno z vláken miRNA duplexu se asociuje ke komplexu RISC a druhé vlákno je ihned degradováno. Komplex miRNA-RISC je připraven na translační represi případně degradaci cílových mRNA. Schopnost miRNA vázat se k cílovým sekvencím i v případě nedokonalé komplementarity je důvodem velkého množství cílových mRNA pro každou jednotlivou miRNA. Podle odhadů bioinformatických analýz tvoří miRNA přibližně 3% genů a mají potenciál regulovat přibližně 30% lidských genů [1,2,3].

Stále více důkazů svědčí pro zásadní roli miRNA v kontrole buněčné proliferace a přežívání tedy procesů bezprostředně souvisejících s onkogenním procesem. Přibližně 50% miRNA genů se nachází na fragilních částech chromozómů, což vede k častým abnormalitám v počtu jejich kopií, zahrnující jak jejich ztrátu tak amplifikaci, právě v případě onkologických onemocnění [4]. MiRNA mohou mít funkci onkogenu nebo nádorového supresoru v závislosti na charakteru cílových kódujících mRNA [2,3]. Významným příkladem miRNA s funkcí nádorového supresoru je rodina miRNA označovaná *let-7* negativně regulující onkogen RAS. Snížená exprese *let-7* v nádorech vede ke zvýšeným hladinám onkogenu RAS a související ztrátě kontroly proliferace [5, 6]. Do regulace dalšího významného onkogenu MYC je zapojen například klastr miR-17-92, miR-142 nebo miR-155 [2,3]. Klasickým případem onkogenní miRNA je miR-21, jejíž antiapoptotický efekt byl pozorován u glioblastomů, ve kterých se miR-21 vyskytovala až ve stonásobně zvýšených hladinách oproti kontrolní zdravé tkáni [7]. Zvýšené hladiny miR-21 byly pozorovány také u mamárního a kolorektálního karcinomu [8, 9]. Díky rychlému vývoji metod jako jsou miRNA mikročipy či varianta kvantitativní RT-PCR sloužící k detekci miRNA se podařilo identifikovat a vyizolovat specifické expresní miRNA profily u všech dosud zkoumaných typů nádorových onemocnění: chronické lymfocytární leukémie [10, 11], mamárního karcinomu [8], glioblastomu [12], karcinomu štítné žlázy [13], hepatocelulárního karcinomu [14], plicního karcinomu [15, 16] a také kolorektálního karcinomu [9,17,18].

Na buněčných liniích karcinomu tlustého střeva byl pozorován nádorově supresorový efekt *let-7a-1*. Transfekce prekurzoru *let-7a-1* do nádorových buněk vedla k signifikantnímu potlačení jejich růstu a byla spojeno se snížením hladin proteinů RAS

a MYC, zatímco hladiny jejich mRNA zůstaly neovlivněny [6]. Ve studii srovnávající hladiny 283 miRNA v nádorové tkáni kolorektálního karcinomu a její korespondující zdravé sliznici u šestnácti pacientů bylo pozorováno globální snížení exprese miRNA v nádorové tkáni, nejvíce signifikantní redukci exprese v karcinomech ovšem vykazovaly miR-143 a miR-145 [17]. Cummins a kol. (2005) a kol. použila varianty metodiky sériové analýzy genové exprese (SAGE) pro miRNA (miRAGE) a identifikovala 50 rozdílně exprimovaných miRNA v kolorektální nádorové tkáni, z těchto miRNA bylo 32 down-regulovaných, součástí této skupiny byly rovněž miR-143 a miR-145. Expresi 156 miRNA srovnával mezi nádorovou tkání a zdravou sliznicí u 12 pacientů a na 16 buněčných liniích kolorektálního karcinomu Bandres a kol. (2006). Studie založená na detekci miRNA přesnou metodou kvantitativní RT-PCR mimo jiné potvrdila předchozí pozorování popisující snížení exprese miR-143 a miR-145 a zvýšení exprese miR-21 v kolorektální nádorové tkáni. Autorům se rovněž podařilo asociovat hladiny miR-31 ke stagingu nádorového onemocnění, klinické stádium IV bylo spojeno s nejvyššími hladinami miR-31 [18]. Z výše uvedeného vyplývá, že v patogenezi kolorektálního karcinomu lze na základě opakovaných pozorování předpokládat onkogenní vlastnosti u miR-21 a miR-31, naopak za nádorové supresory lze považovat *let-7-a*, miR-143 a miR-145.

Zatímco v případech hematologických malignit, ale i mamárního karcinomu nebo karcinomu plic, již proběhly či právě probíhají klinické především prognostické studie založené na stovkách pacientů s velice slibnými výsledky [8, 11, 16], výzkum miRNA u kolorektálního karcinomu doposud probíhal především na buněčných liniích nebo na úrovni pilotních studií na souborech čítajících okolo 20 pacientů.

Cílem naší studie je analyzovat metodou kvantitativní RT-PCR expresi vybraných, na základě současných poznatků relevantních mikroRNA (miR-21, miR-31, *let-7-a*, miR-143 a miR-145) v nádorové tkáni a zdravé sliznici u souboru přibližně 50 pacientů s kolorektálním karcinomem, a korelovat ji s vybranými klinicko-patologickými charakteristikami. Značná část pracovního souboru pacientů byla již dříve molekulárně charakterizována pomocí komerčních oligonukleotidových makročipů a pro některé miRNA jsou tedy známy hladiny jejich cílových mRNA. Plánujeme proto také stanovení hladin vybraných korespondujících proteinů (RAS, MYC, ...), abychom mohli potvrdit případně vyvrátit předpokládaný post-transkripční regulační účinek konkrétní miRNA na konkrétní kódující mRNA.

Literatura

1. Gregory RI, Shiekhattar R: MicroRNA biogenesis and cancer. *Cancer Res* 65:3509-12, 2005
2. Chen CZ: MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *N Engl J Med* 353:1768-71, 2005
3. Esquela-Kerscher A, Slack FJ: Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6:259-69, 2006
4. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al: Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2999-3004, 2004
5. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al: RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 120:635-47, 2005
6. Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T: let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells. *Biol Pharm Bull* 29:903-6, 2006
7. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS: MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 65:6029-33, 2005
8. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al: MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 65:7065-70, 2005
9. Bandres E, Cubedo E, Agirre X, et al: Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol Cancer* 5:29, 2006
10. Borkhardt A, Fuchs U, Tuschl T: MicroRNA in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 354:524-5; author reply 524-5, 2006
11. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al: A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 353:1793-801, 2005
12. Ciafre SA, Galardi S, Mangiola A, et al: Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun* 334:1351-8, 2005
13. He H, Jazdzewski K, Li W, et al: The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:19075-80, 2005
14. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, et al: Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene* 25:2537-45, 2006
15. Eder M, Scherr M: MicroRNA and lung cancer. *N Engl J Med* 352:2446-8, 2005
16. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al: Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 9:189-98, 2006
17. Michael MZ, SM OC, van Holst Pellekaan NG, et al: Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 1:882-91, 2003
18. Cummins JM, He Y, Leary RJ, et al: The colorectal microRNAome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:3687-92, 2006

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NR/9076-4