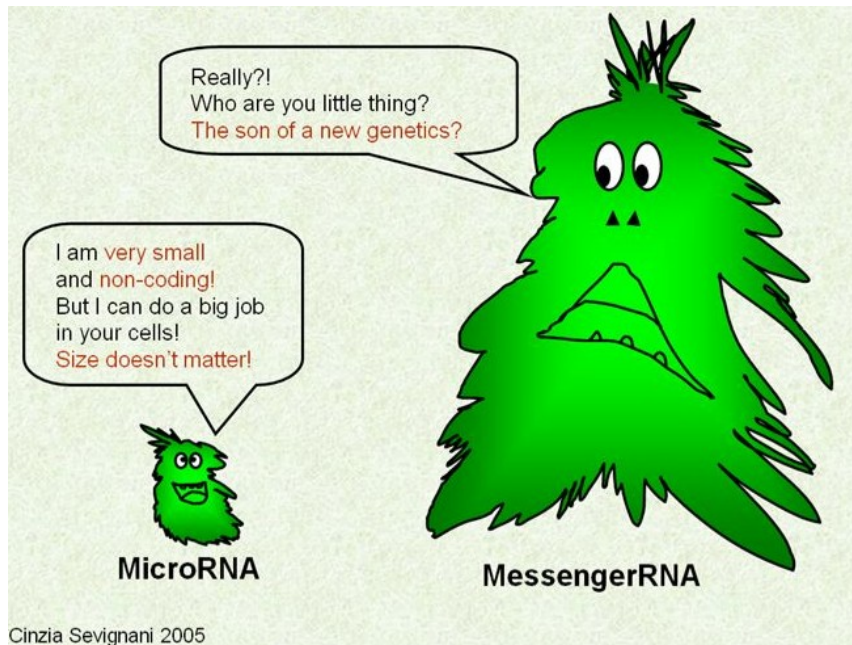


MikroRNA: biomarkery a potenciální terapeutické cíle v onkologii

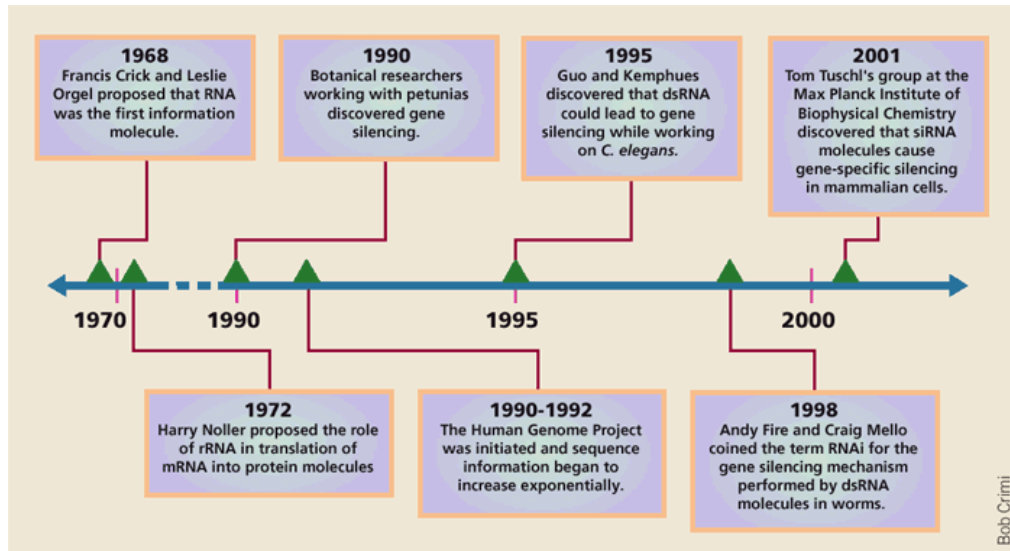
Ondřej Slabý

Masarykův onkologický ústav

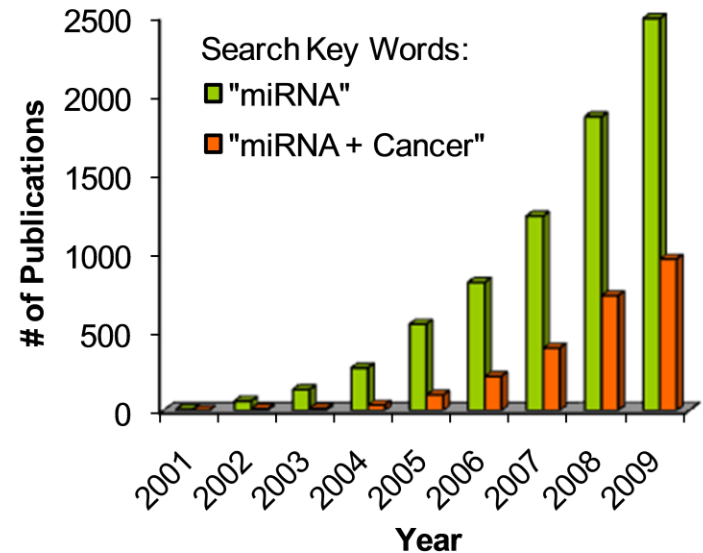
Klinika komplexní onkologické péče, Centrum pro aplikovaný výzkum v onkologii



Proč se zabývat výzkumem mikroRNA?



Nature Biotechnology 21, 1441 - 1446 (2003)



10.10.2010 PubMed - „MicroRNA AND Cancer“ – 3157 odkazů
„MicroRNA“ – 8921 odkazů

Proč se zabývat výzkumem mikroRNA?

The colorectal microRNAome

Jordan M. Cummins¹, Yiping He², Rebecca J. Leary¹, Ray Pagliarini¹, Luis A. Diaz, Jr.¹, Tobias Sjöblom¹, Omer Barad², Zvi Bentwich², Anna E. Szafranska³, Emmanuel Labourier³, Christopher K. Raymond¹, Brian S. Roberts¹, Hartmut Juhl¹, Kenneth W. Kinzler¹, Bert Vogelstein^{1,††}, and Victor E. Velculescu^{1,††}

PNAS | March 7, 2006 | vol. 103 | no. 10 | 3687–3692

A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets

Stefano Volinia^{††}, George A. Calin^{††}, Chang-Gong Liu^{*}, Stefan Ambros³, Amelia Cimmino^{*}, Fabio Petrocchi^{*}, Rosa Visone^{*}, Marilena Iorio^{*}, Claudia Roldo^{*}, Manuela Ferracin³, Robyn L. Pruett⁵, Nozomu Yanai⁴, Giovanni Lanza³, Aldo Scarpa¹, Andrea Vecchione^{††}, Massimo Negrini³, Curtis C. Harris⁵, and Carlo M. Croce^{††}

PNAS | February 14, 2006 | vol. 103 | no. 7 | 2257–2261

A MicroRNA Signature Associated with Prognosis and Progression in Chronic Lymphocytic Leukemia

George Adrian Calin, M.D., Ph.D., Manuela Ferracin, Ph.D., Amelia Cimmino, M.D., Ph.D., Gianpiero Di Leva, Ph.D., Masayoshi Shimizu, B.S., Sylwia E. Wojcik, M.Sc., Marilena V. Iorio, Ph.D., Rosa Visone, Ph.D., Nurettin Ilfer Sever, Ph.D., Muller Fabbri, M.D., Rodolfo Iuliano, Ph.D., Tiziana Palumbo, Ph.D., Flavia Pichiorri, Ph.D., Claudia Roldo, M.D., Ramiro Garzon, M.D., Cinzia Sevignani, Ph.D., Laura Rassenti, Ph.D., Hansjuerg Alder, Ph.D., Stefano Volinia, Ph.D., Chang-gong Liu, Ph.D., Thomas J. Kipps, M.D., Ph.D., Massimo Negrini, Ph.D., and Carlo M. Croce, M.D.

N ENGL J MED 353:17 WWW.NEJM.ORG OCTOBER 27, 2005

MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer

Marilena V. Iorio¹, Manuela Ferracin², Chang-Gong Liu¹, Angelo Veronese², Riccardo Spizzo², Silvia Sabbioni⁴, Eros Magri³, Massimo Pedriali³, Muller Fabbri¹, Manuela Campiglio⁴, Sylvie Ménard³, Juan P. Palazzo⁴, Anne Rosenberg⁵, Piero Musiani⁶, Stefano Volinia¹, Italo Nenci², George A. Calin¹, Patrizia Querzoli², Massimo Negrini², and Carlo M. Croce¹

Cancer Res 2005; 65: (16), August 15, 2005

Molecular Cancer



Review

MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application

Ondrej Slaby^{*†1,2}, Marek Svoboda^{†1}, Jaroslav Michalek² and Rostislav Vyzula¹

Open Access

Biochemical and Biophysical Research Communications 385 (2009) 1–5



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc



Oncology

Laboratory/Clinical Translational Research

Oncology 2007;72:397–402
DOI: [10.1159/000113489](https://doi.org/10.1159/000113489)

Received: August 10, 2007
Accepted: August 10, 2007
Published online: January 15, 2008

Mini Review

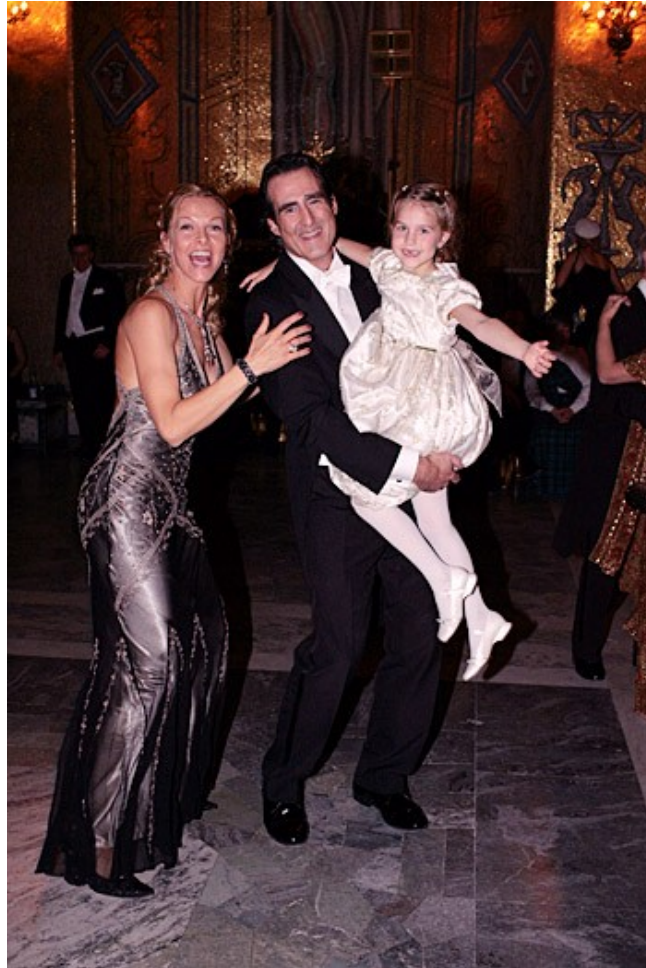
MicroRNA involvement in glioblastoma pathogenesis

Jana Novakova^{a,d}, Ondrej Slaby^{a,b,*}, Rostislav Vyzula^c, Jaroslav Michalek^a

Altered Expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 Is Related to Clinicopathologic Features of Colorectal Cancer

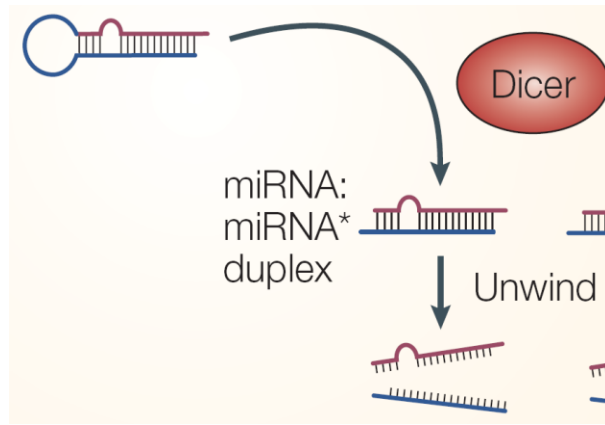
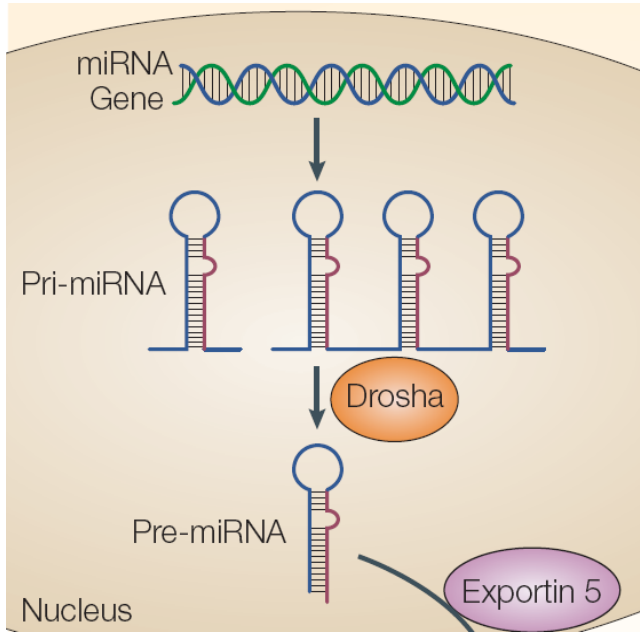
O. Slaby^{a,c}, M. Svoboda^{b,c}, P. Fabian^a, T. Smerdova^a, D. Knoflickova^a, M. Bednarikova^{b,c}, R. Nenutil^a, R. Vyzula^{b,c}

Proč se zabývat výzkumem mikroRNA?



Craig Mello na slavnostním banketu po udílení Nobelových cen za rok 2006.

Biogeneze a funkce mikroRNA

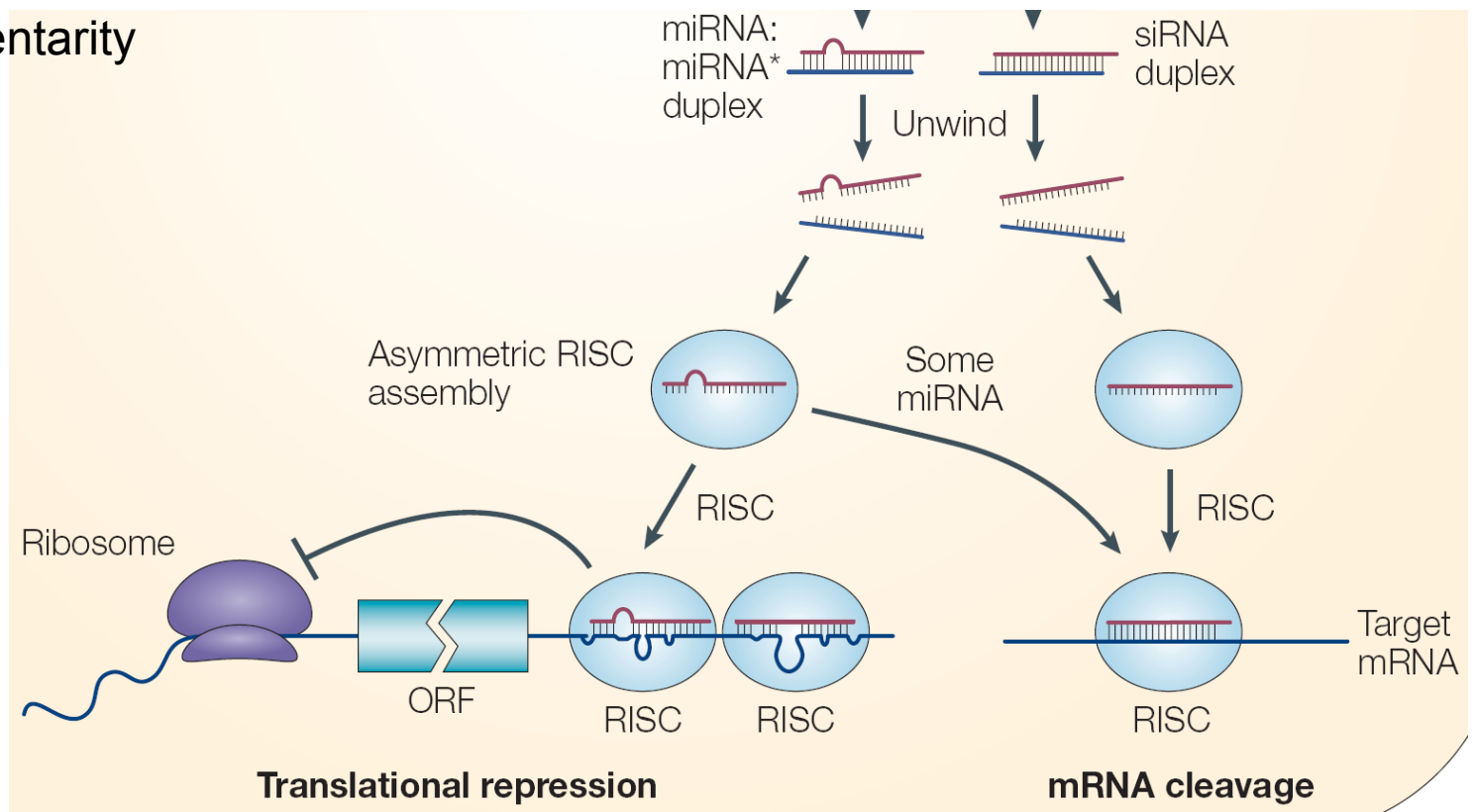


1. Transkripce miRNA genu
2. pri-miRNA jsou zpracovány pomocí RNáz Drosha a Pasha
3. pre-miRNA exportovány pomocí Exportinu 5 do cytoplazmy
4. Zpracování pomocí RNázy Dicer

microRNA: licensed to kill messenger

5. Aktivní vlákno je inkorporováno do komplexu RISC
6. Represe translace nebo degradace mRNA v závislosti na míře komplementarity

Biogeneze a funkce mikroRNA



Základní fakta o mikroRNA

miRNA poprvé popsal Ambros a kol. (1993) u *C. elegans* (*lin-4*)

Přibližně 3% predikovaných lidských genů jsou geny pro miRNA

miRNA mají potenciál regulovat asi 1/3 kódujících genů

Některé miRNA jsou kódovány více než jedním genem

Geny kódující miRNA jsou často klastrovány (klastr miR-17)

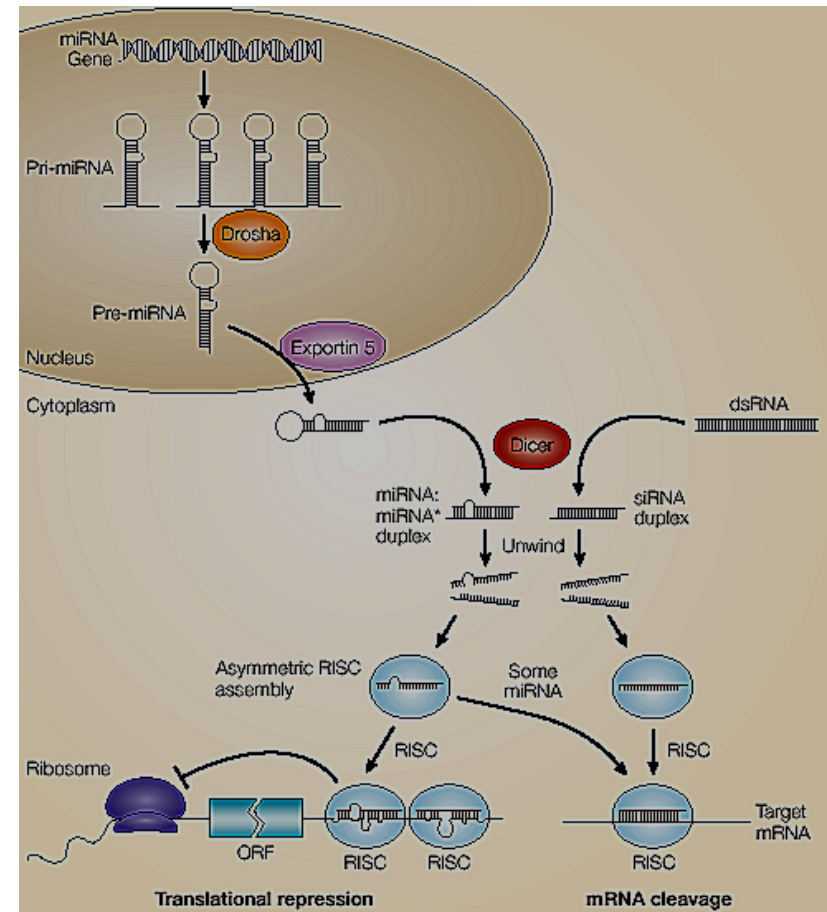
Geny miRNA jsou lokalizovány v mezigenových oblastech, v intronových oblastech nebo antisense řetězcích známých genů

miRNA family members can be very similar eg *let-7* family:

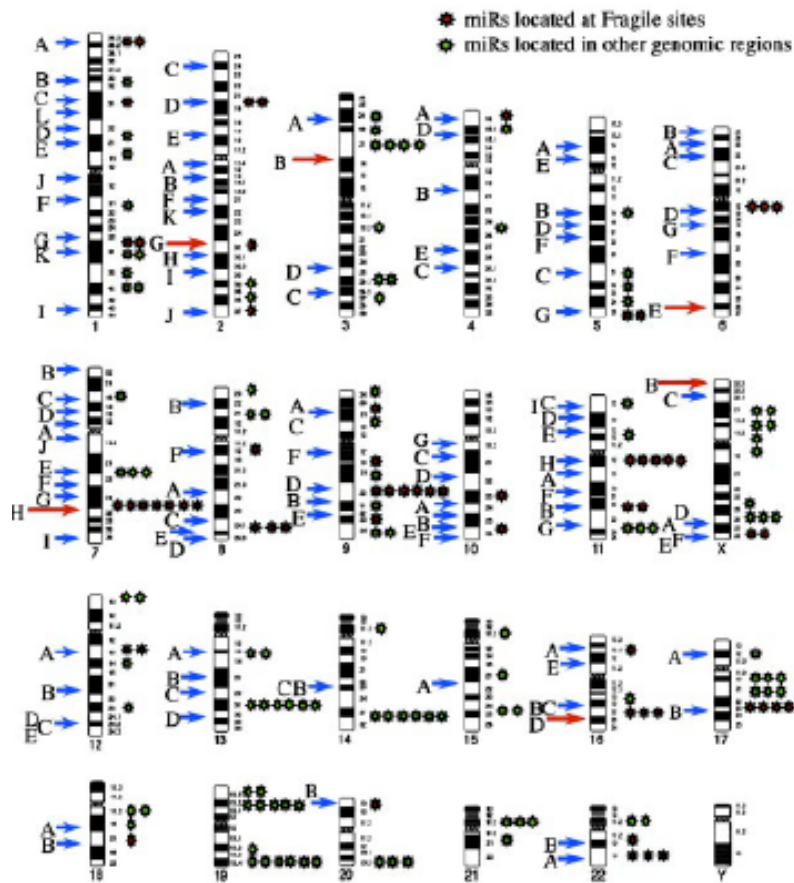
```
mmu-let-7a:  UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
mmu-let-7b:  UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
mmu-let-7c:  UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU
mmu-let-7d:  AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU
mmu-let-7e:  UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU
mmu-let-7f:  UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU
mmu-let-7g:  UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU
mmu-let-7i:  UGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUU
```

Jaký je rozdíl mezi miRNA a siRNA?

- Funkce obou je regulace exprese
- siRNA je původem dsRNA
- siRNA souvisí s cizorodou RNA (obvykle virovou) a je 100% komplementární
- miRNA je původně endogenní ssRNA, která formuje vlásenkové dsRNA struktury
- miRNA reguluje post-transkripční genovou expresi



Význam mikroRNA v nádorové biologii



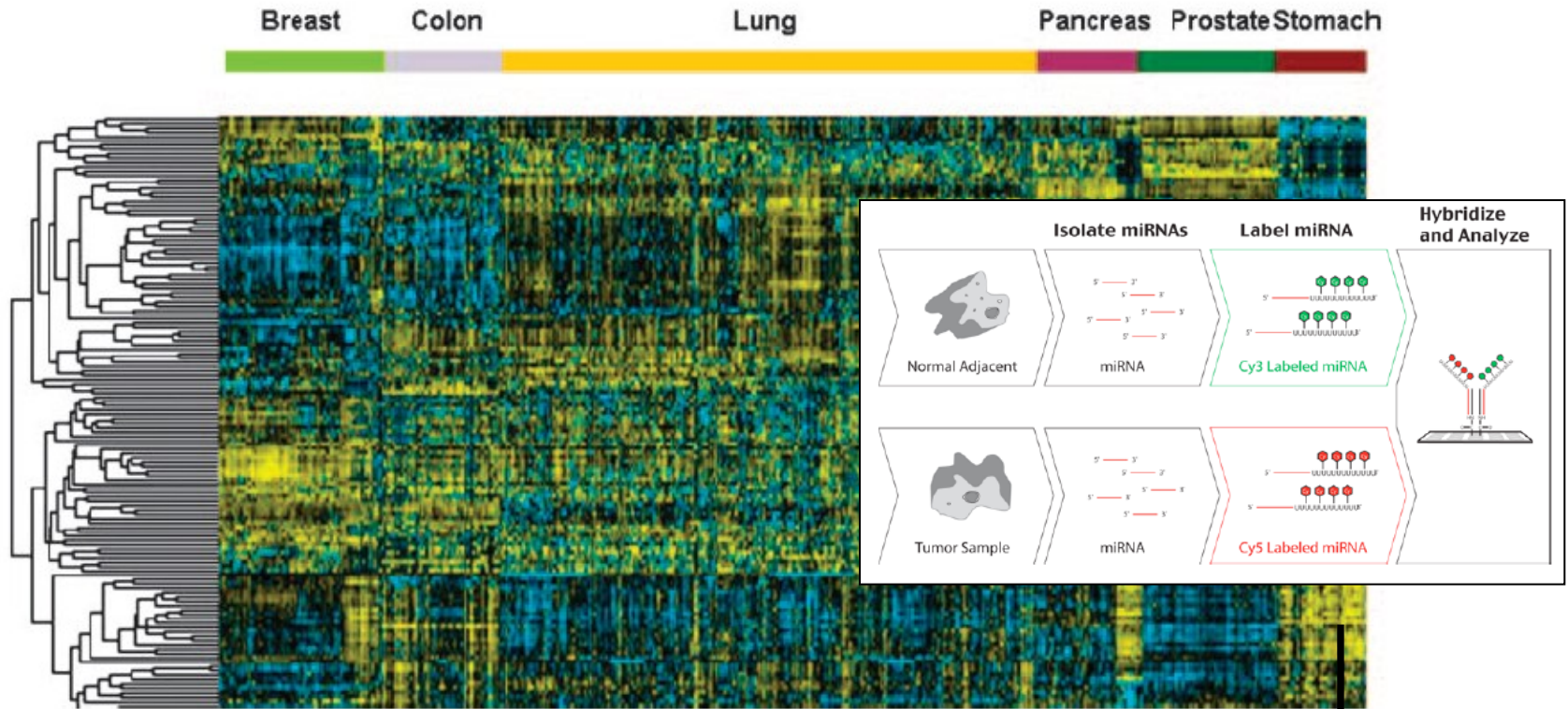
Calin et al., PNAS, 2004

Přibližně 50% miRNA genů se nachází na fragilních částech chromosomů, jejichž ztráta nebo amplifikace je často detekována u nádorových onemocnění.

Např. miR-15a a miR-16a jsou lokalizované v oblasti 13q14, často deletované u CLL

Význam mikroRNA v nádorové biologii

Rozdílné expresní profily mezi nádorovou a nenádorovou tkání

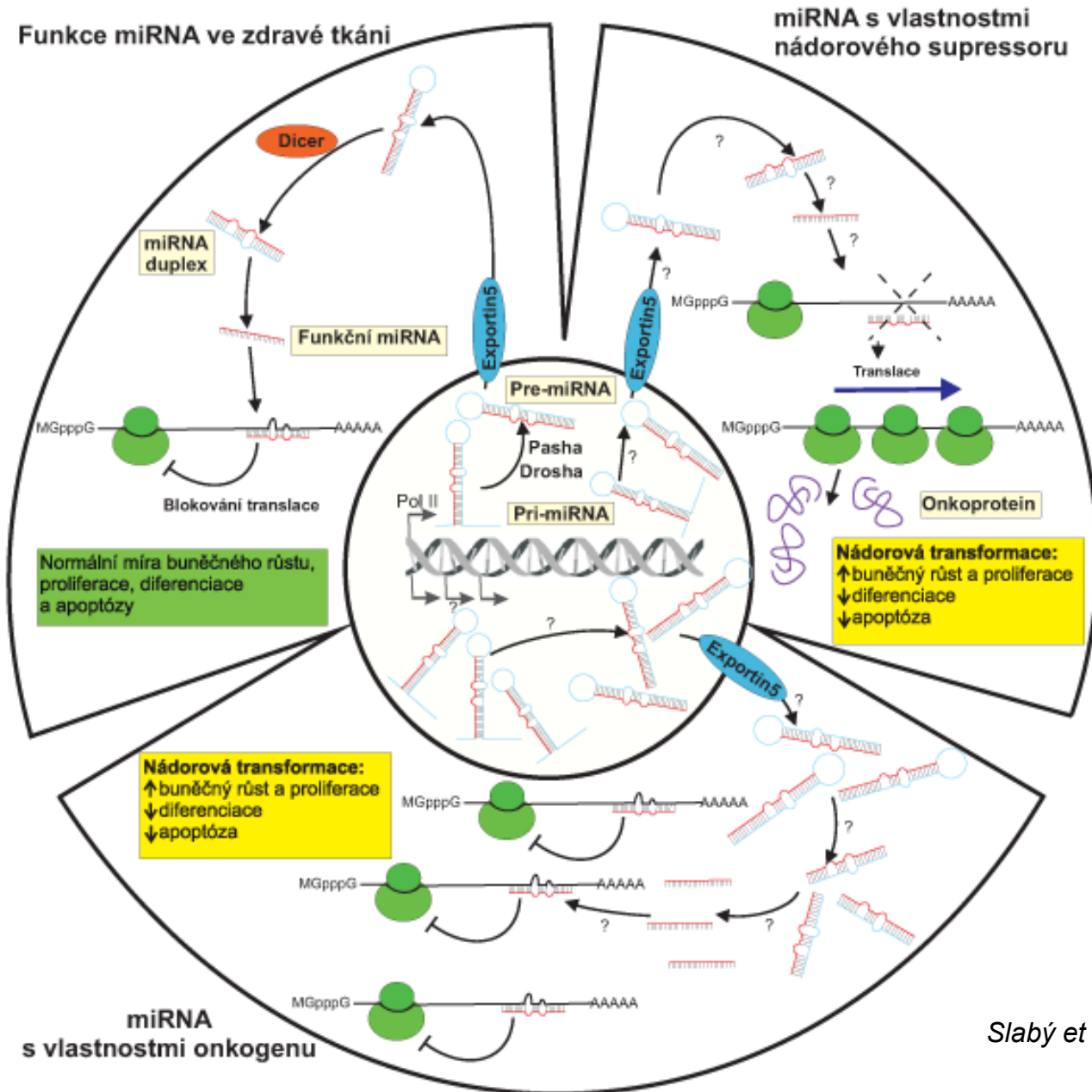


Volinia et al., PNAS, 2006

Shluková analýza 540 vzorků šesti druhů solidních nádorů a příslušných nenádorových tkání.

Žlutá znamená zvýšenou expresi oproti kontrolnímu (nenádorovému) vzorku

Význam mikroRNA v nádorové biologii



Význam mikroRNA v nádorové biologii

Tabulka 1: Přehled nejstudovanějších miRNA s onkogenní nebo nádorově supresorovou funkcí

miRNA	Lokalizace	OG/TS	Potvrzené cílové molekuly	Nádorové onemocnění	Reference
miR-15a miR-16-1	13q14	TS	BCL2	↓ CLL, mnohočetný myelom, lymfom z buněk pláště, karcinom prostaty	9, 23, 24
miR-143 miR-145	5q32-33	TS	ERK5 ?	↓ kolorektální a mamární karcinom	10–14
rodina let-7	různé	TS	RAS	↓ karcinom plic	15, 16
miR-34a	1p36.23	TS	E2F3	↓ neuroblastom	21
miR-21	17q23.2	OG	nepřímo BCL2	↑ glioblastom, mamární a kolorektální karcinom	10-14, 22
skupina miR-17-92	13q31-32	OG	E2F1, PTEN, TGFBR2	↑ difúzní velkobuněčný B-lymfom, karcinom plic	9, 37
BIC/miR-155	21q21	OG	AT1R	↑ Burkittův, Hodgkinův a difúzní velkobuněčný B-lymfom	25-27
miR-372 miR-373	?	OG	LATS2	↑ testikulární nádory z germinálních buněk	22
miR-221 miR-146b	?	OG	?	↑ papilární karcinom štítné žlázy	18

↑↓ - zvýšená resp. snížená hladina dané miRNA v nádorové tkáni oproti příslušné nenádorové tkáni či buňkám

OG - onkogen, TS - tumor supresorový gen, CLL - chronická lymfocytární leukémie

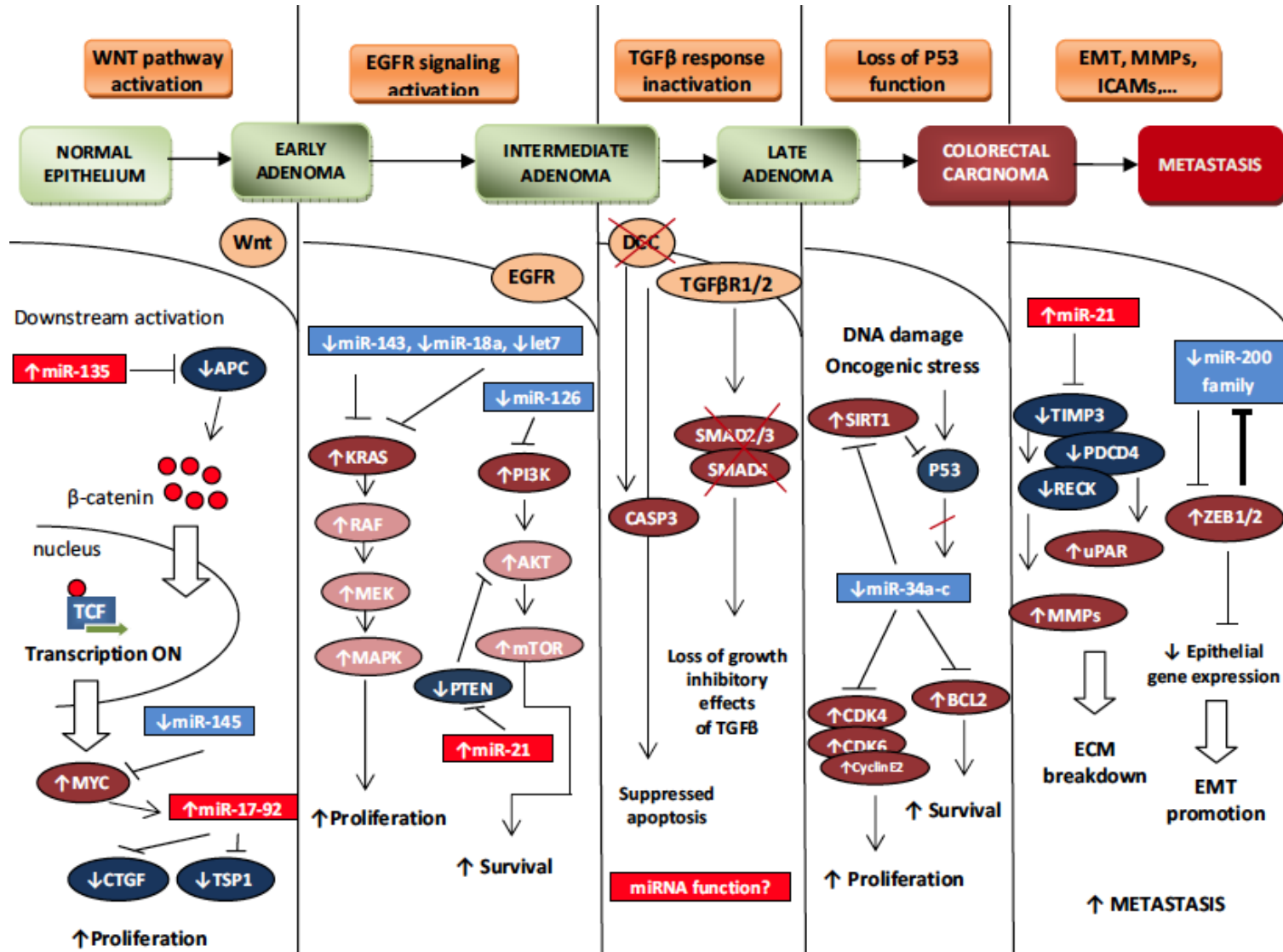
ERK5 - extracelulárním signálem regulovaná kináza 5, PTEN - fosfatázový a tenzinový homolog

TGFBR2 - receptor typ 2 pro transformující růstový faktor, AT1R - receptor typ 1 pro angiotenzin II

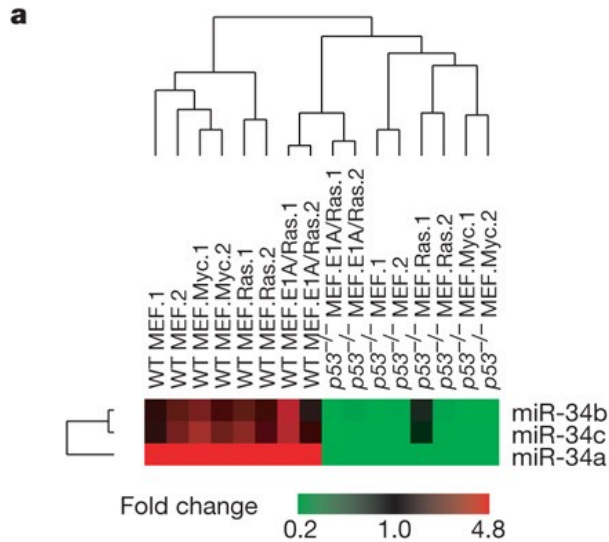
LATS2 - large tumor supressor homolog 2 (inhibitor cyklin dependentní kinázy 2)

Význam mikroRNA v nádorové biologii

Rozšíření Vogelsteinova modelu kancerogeneze CRC



Význam mikroRNA v nádorové biologii

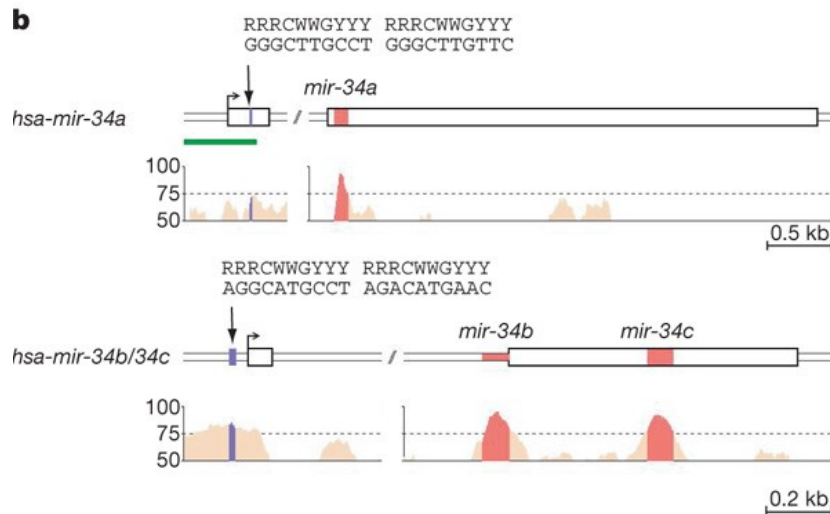


Malý pomocníci ve službách strážce genomu - **rodina mikroRNA-34 a p53**

Pomocí exprese miR-34 (a-c) lze rozlišit wt a p53 deficientní buněčné linie

Zvýšená exprese miR-34 (a-c) je spojena se zástavou buněčného cyklu

miR-34-a až c jsou pod přímou transkripční kontrolou p53



Le H, Nature, 2007

Význam mikroRNA v nádorové biologii - FFPE

MikroRNA nepodléhají degradačním procesům při fixaci formalinem a archivaci v parafinových bločcích tak významně jako mRNA

→ ZPŘÍSTUPNĚNÍ BOHATÝCH ARCHIVŮ NA PATOLOGÍCH K RETROSPEKTIVNÍM STUDIÍM !!!

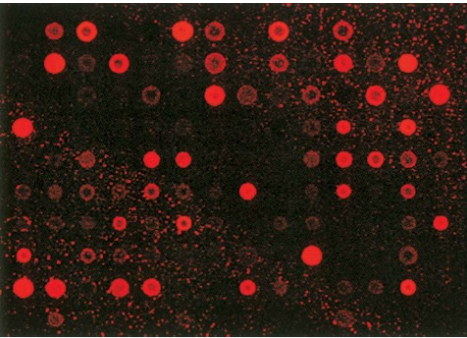
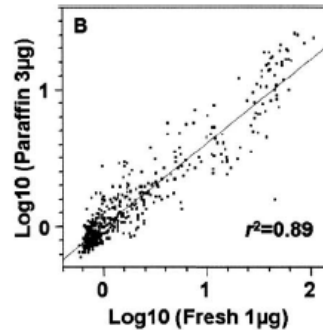
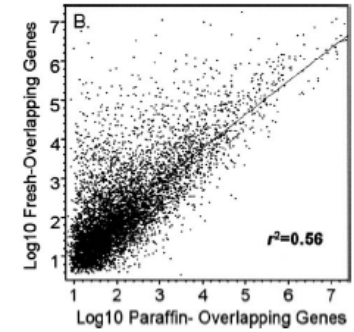
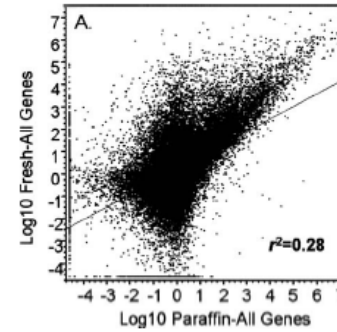


FIGURE 7. Representative miRNA array image from a 10-yr-old FFPE colon cancer sample.

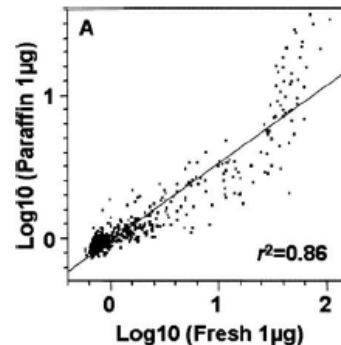


versus



mikroRNA z FFPE

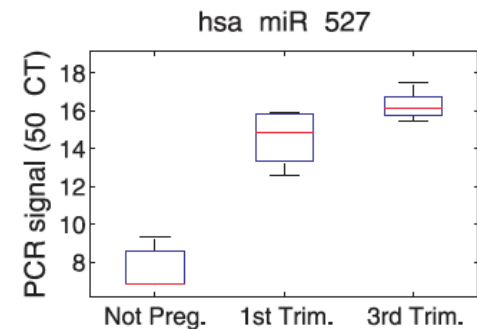
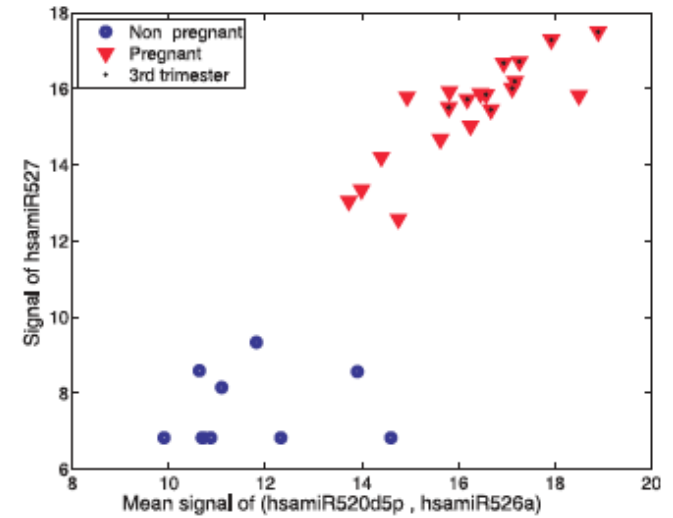
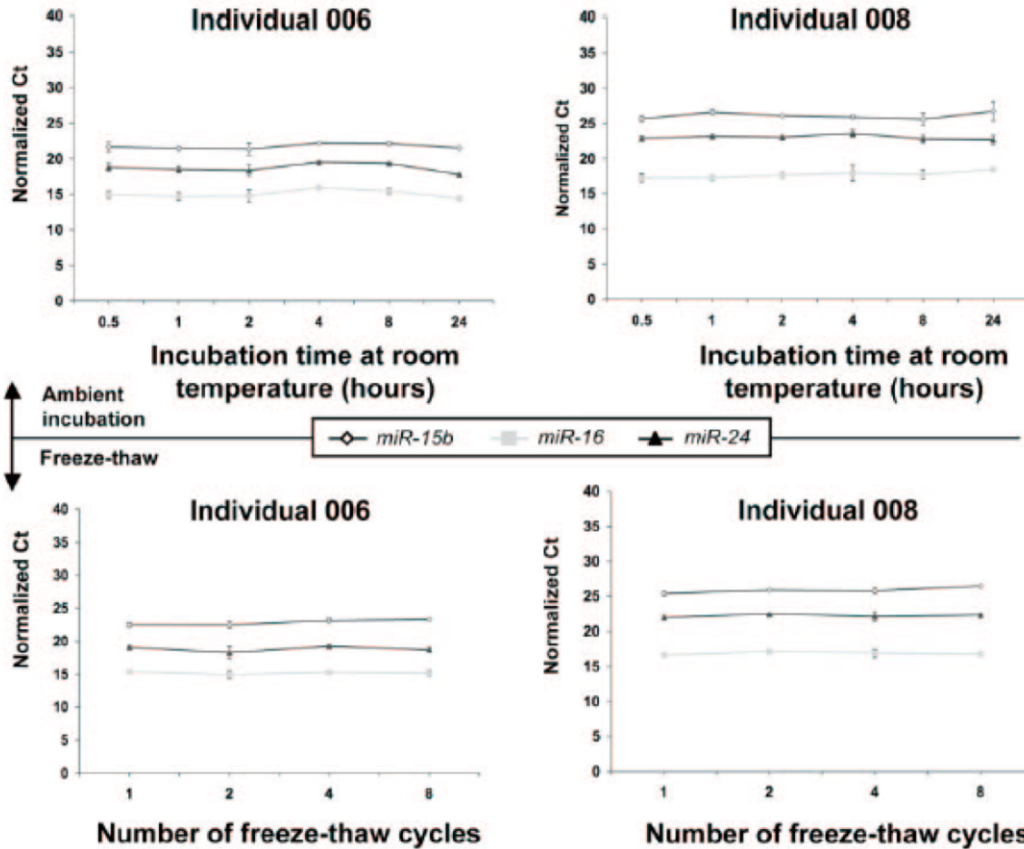
mRNA z FFPE



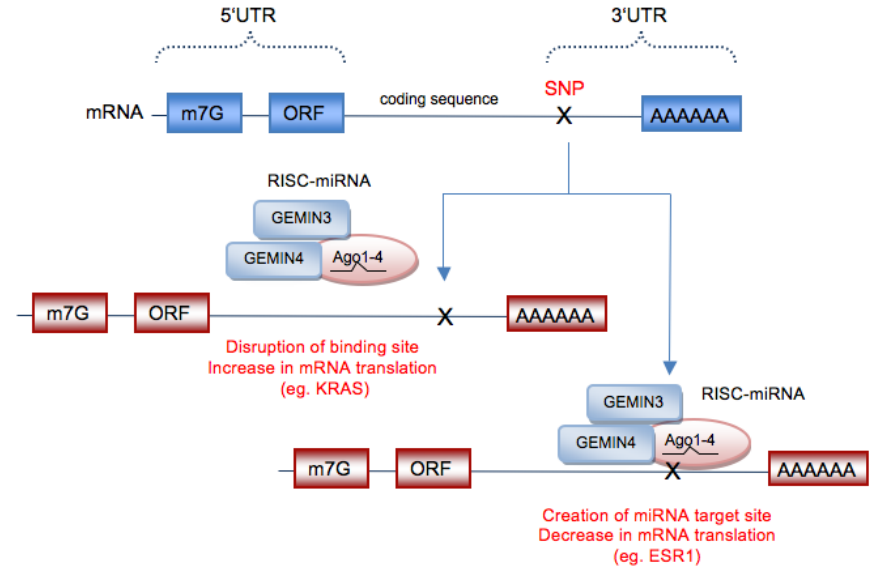
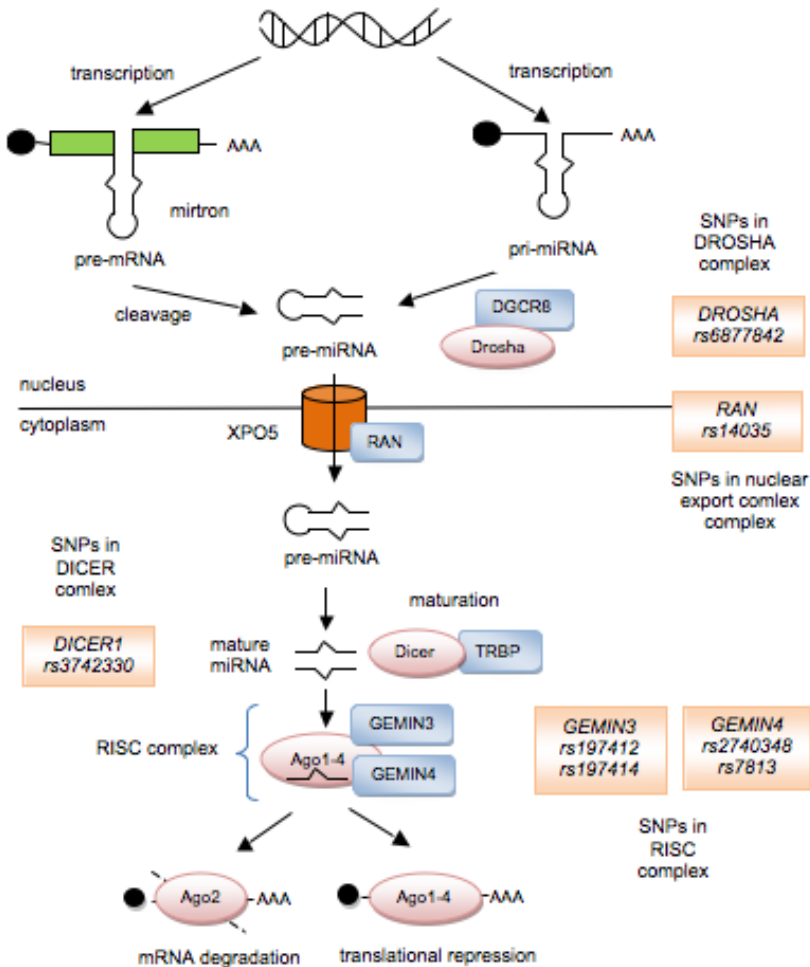
Yaguang Xi, RNA, 2007, 13:1-7

Význam mikroRNA v nádorové biologii – cirkulující mikroRNA!!!

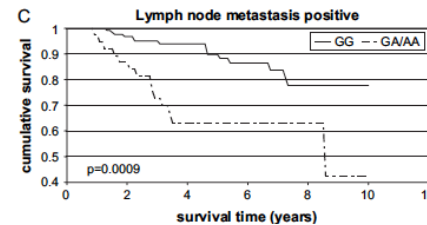
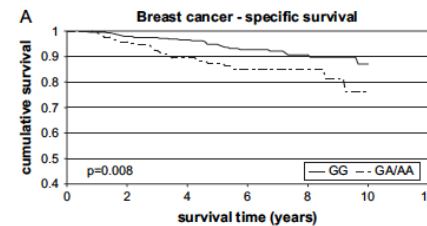
A



Význam mikroRNA v nádorové biologii – mikroRNA SNP - nový směr molekulární epidemiologie nádorových onemocnění!!!



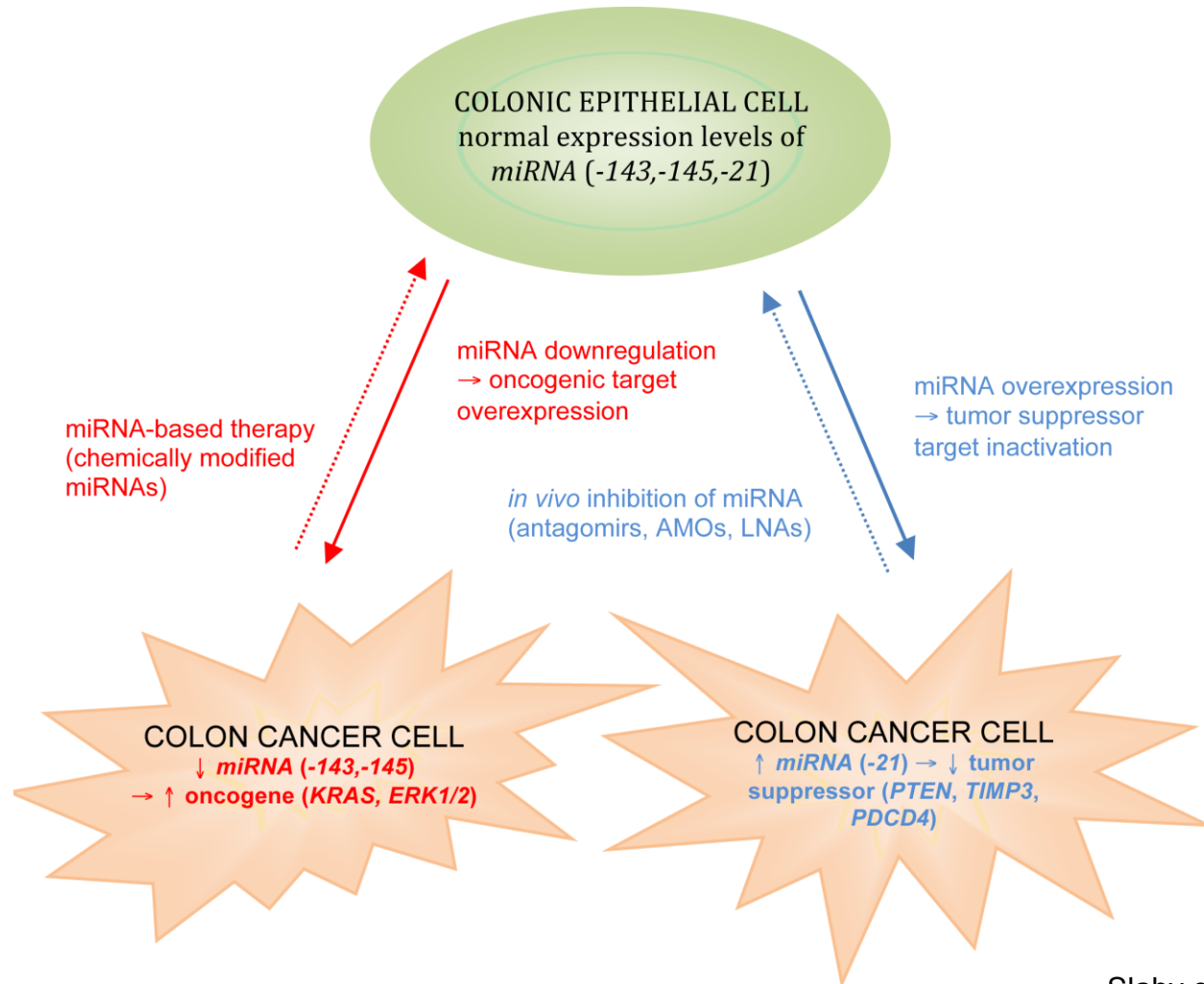
Slaby et al., 2010



1. SNP v biogenezi miRNA
2. SNP v pri-,pre- a miRNA sekvenci
3. SNP ve vazebných místech miRNA

G/A ITGB4 (miR-34a) Brendle et al, Carcinogenesis 2009

mikroRNA: potenciální využití v terapii nádorových onemocnění



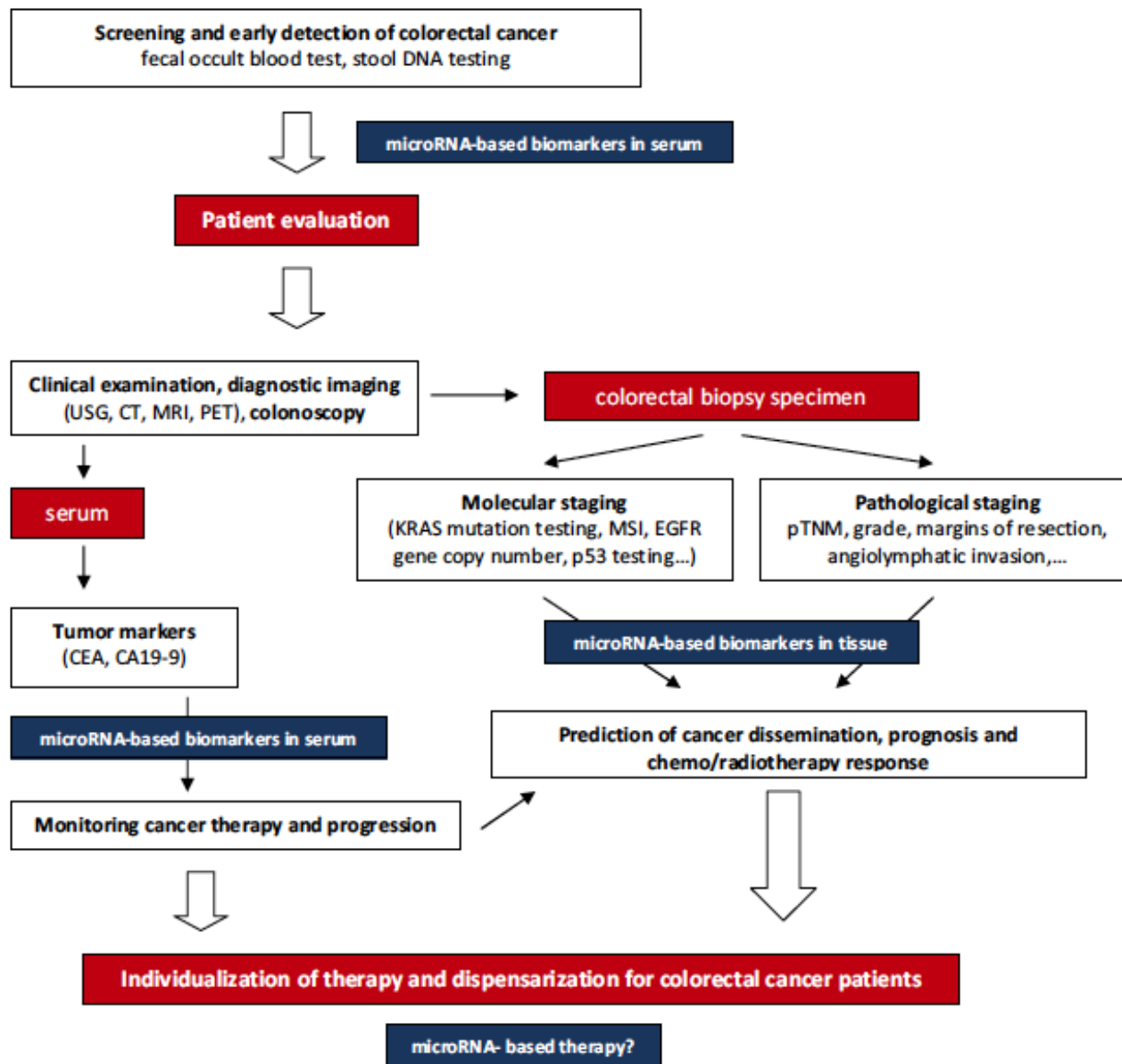
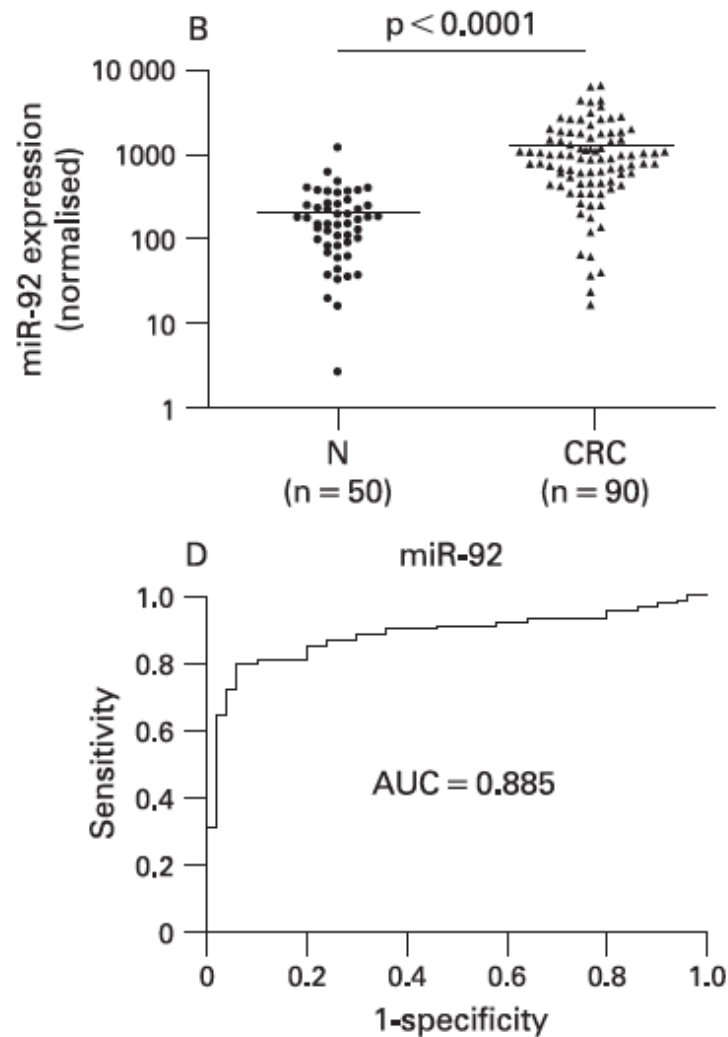
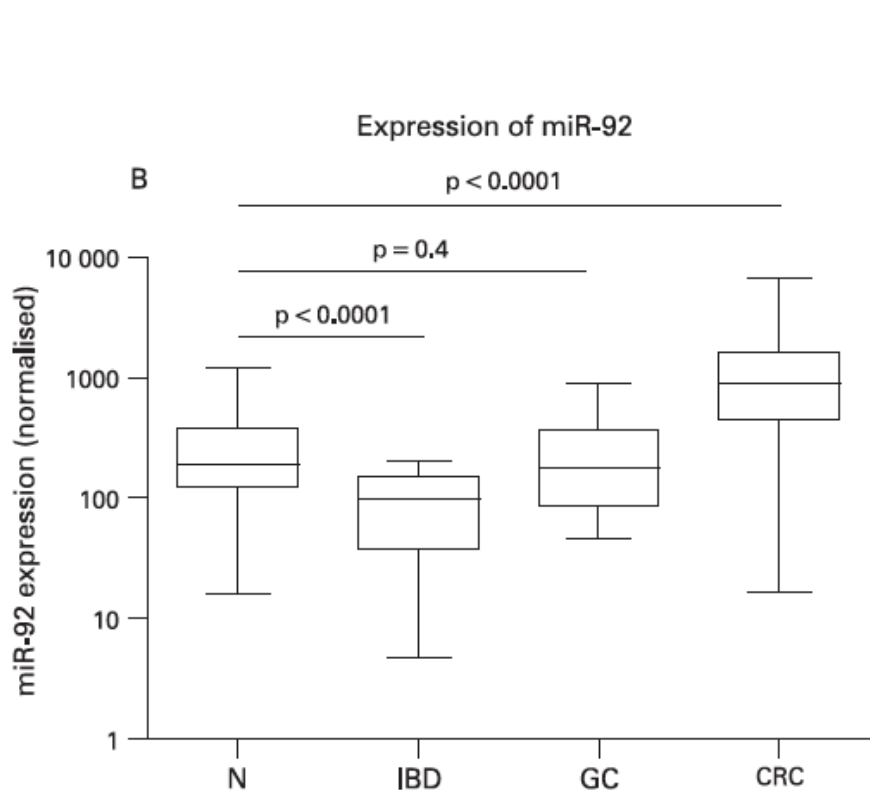


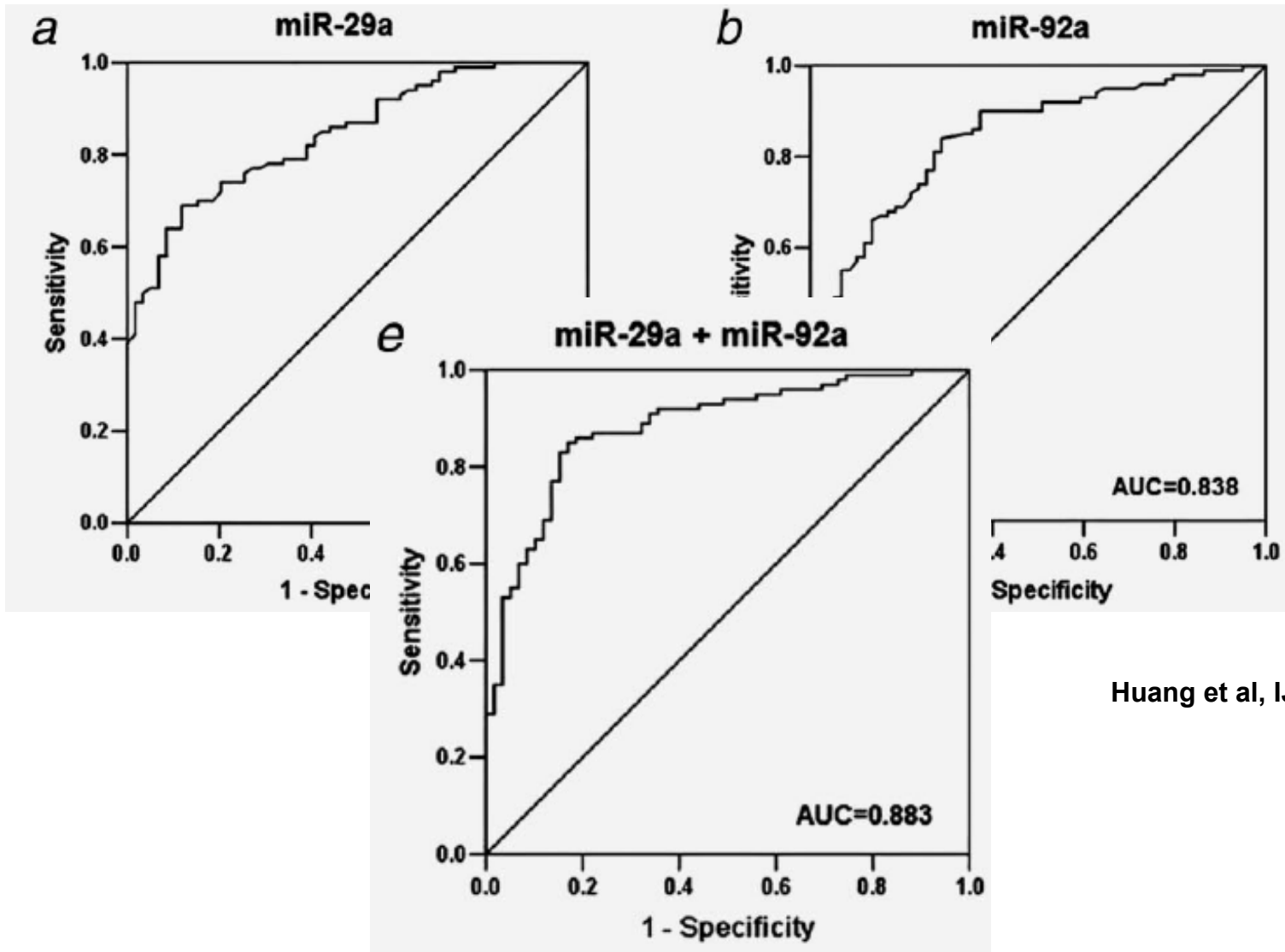
Figure 2
The potential usage of miRNAs in the clinical management of the colorectal cancer patients.

MikroRNA: markery časného záchytu kolorektálního karcinomu



**mikroRNA vykazují vysokou míru stability v krevním séru
a jsou proto vhodnými kandidáty pro diagnostické markery**

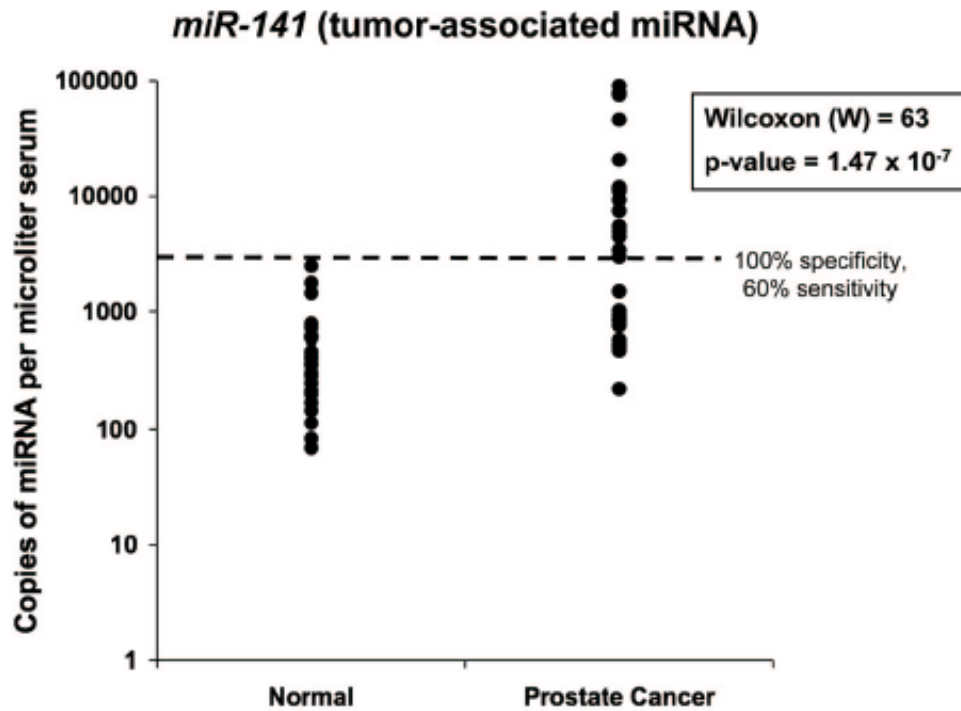
MikroRNA: markery časného záchytu kolorektálního karcinomu



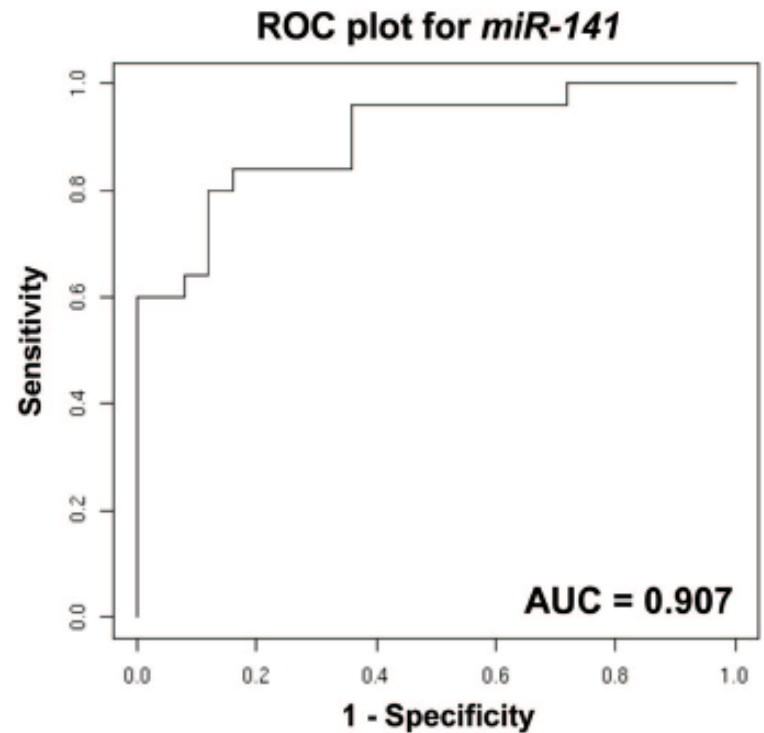
Huang et al, IJC, 2010

83% senzitivita, 85% specifita

miR-141 jako diagnostický marker karcinomu prostaty

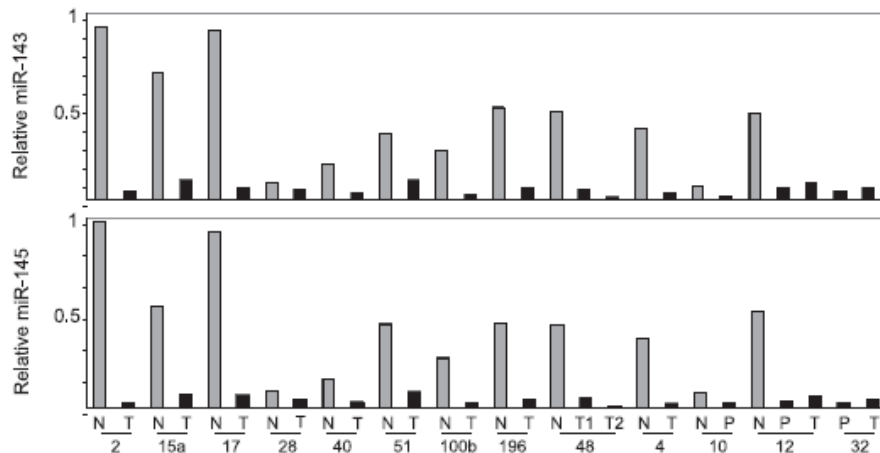
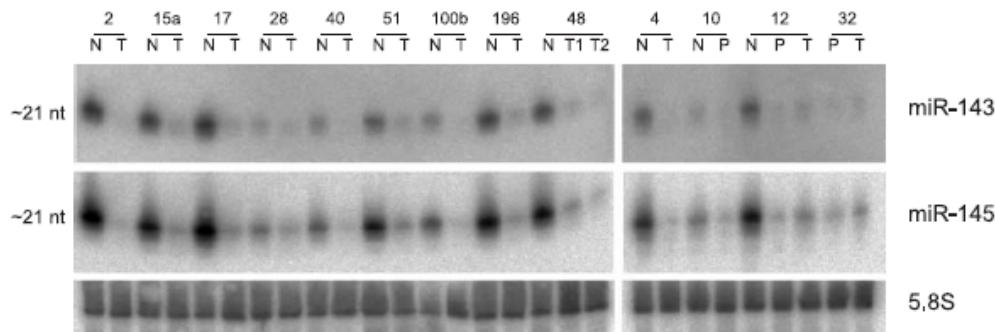


Vysoká míra korelace s PSA!



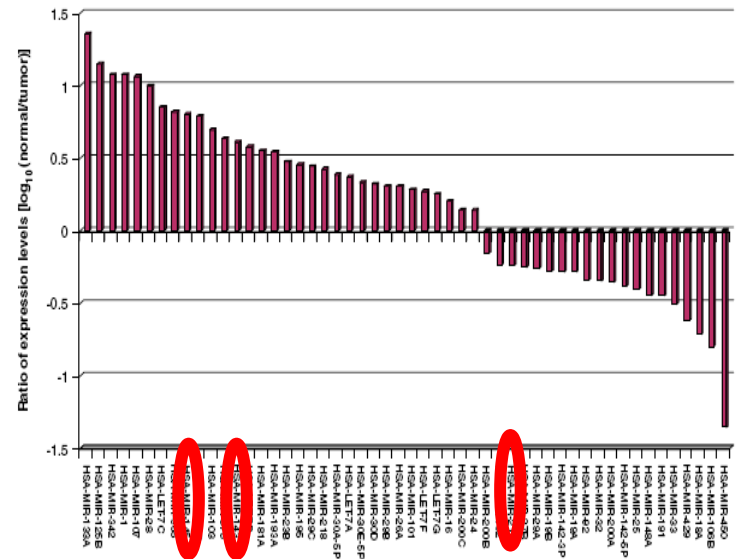
Mitchell, PNAS, 2008

Srovnání expresních profilů mikroRNA v CRC a nenádorové střevní tkáni



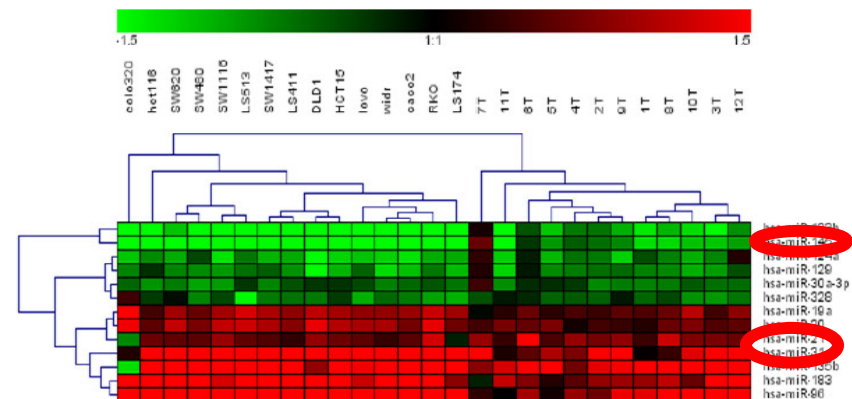
Michael et al., Molecular Cancer Research, 2003

Stanovení profilů miRNA metodou miRAGE



Cummins et al., PNAS, 2006

Srovnání profilů miRNA metodou Real-Time PCR



Bandres et al., Molecular Cancer, 2006

miR-21: diagnostický marker kolorektálního karcinomu

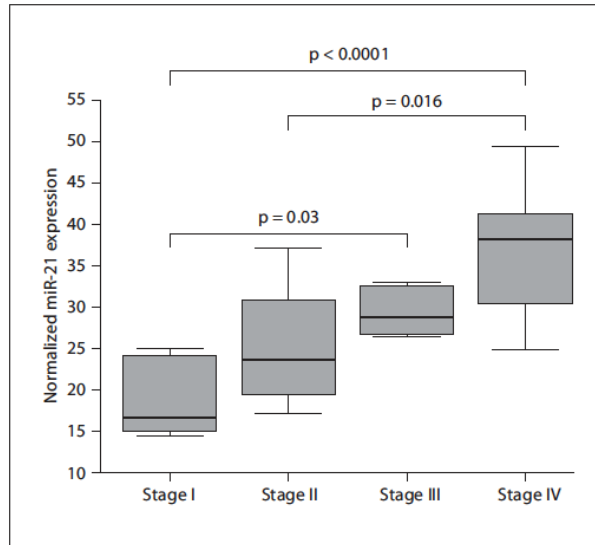
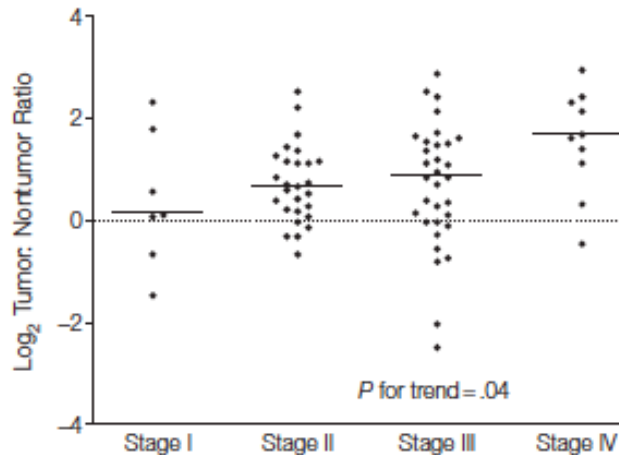


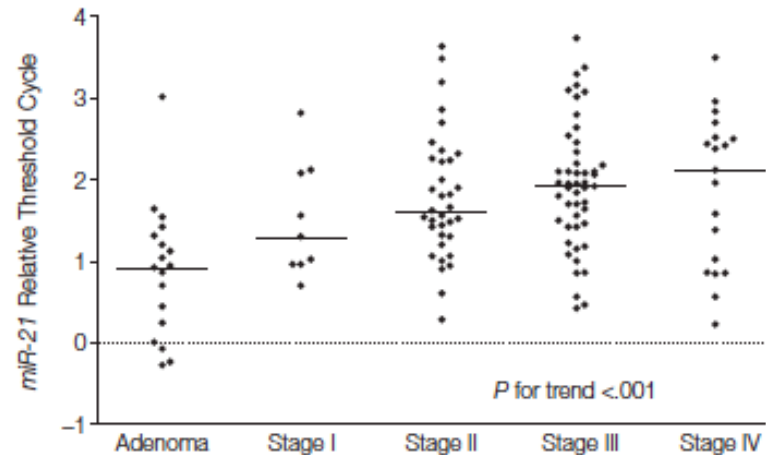
Fig. 1. Correlation between clinical stage and normalized expression of miR-21 in patients with CRC.

Slaby et al, Oncology,
Published online: January 15, 2008 ☺

A Maryland test cohort (microarray data)



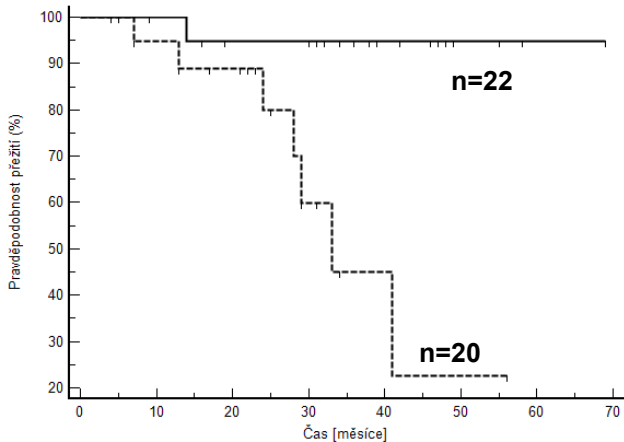
B Hong Kong validation (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction data)



Schetter et al, JAMA, January 30, 2008

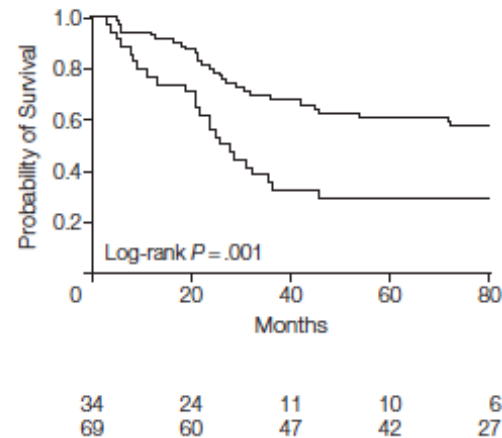
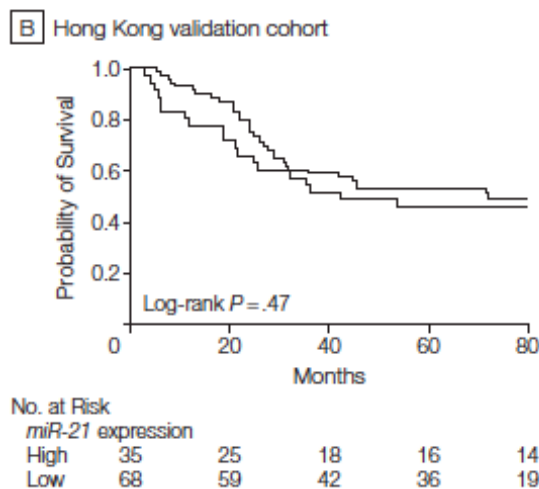
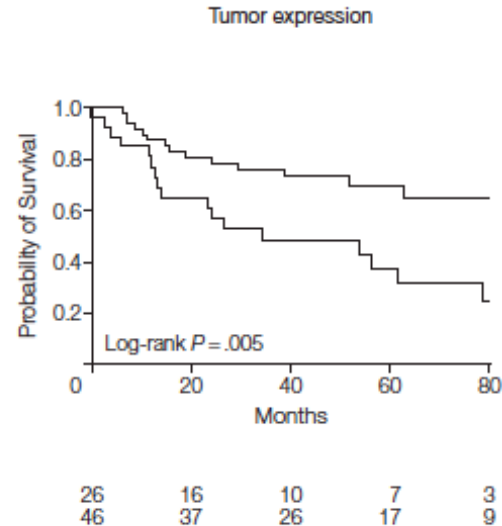
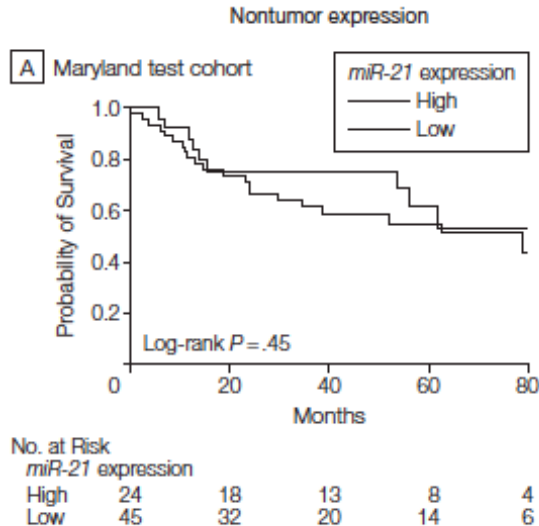
miR-21: prognostický a prediktivní marker kolorektálního karcinomu

Effect of miR-21 levels on overall survival of CRC patients



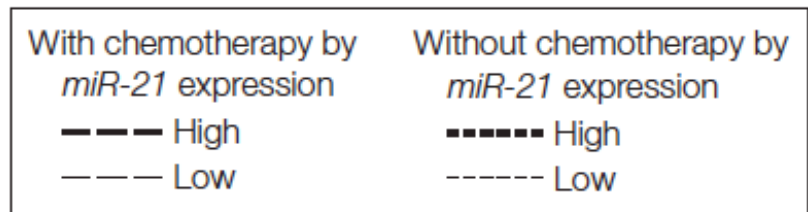
Long-rank $p=0,0015$

Slaby et al., 2010

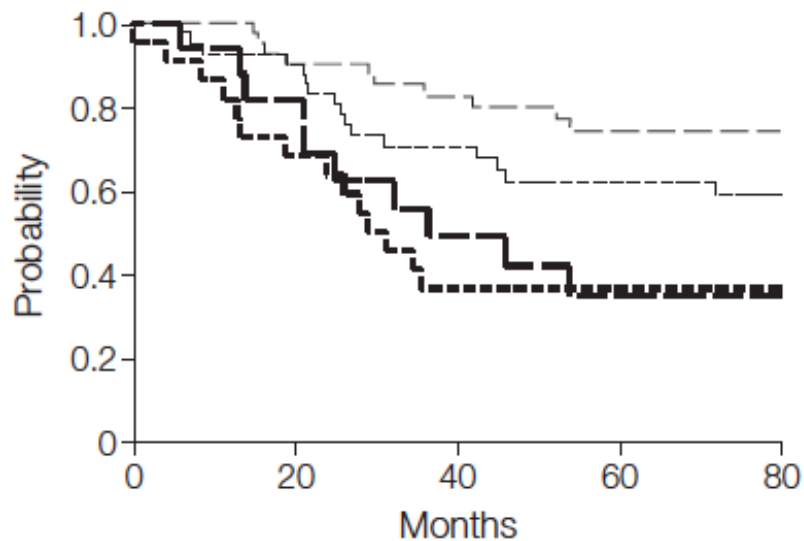


Schetter et al, JAMA, 2008

miR-21: prognostický a prediktivní marker kolorektálního karcinomu



miR-21 expression and adjuvant chemotherapy



No. at Risk

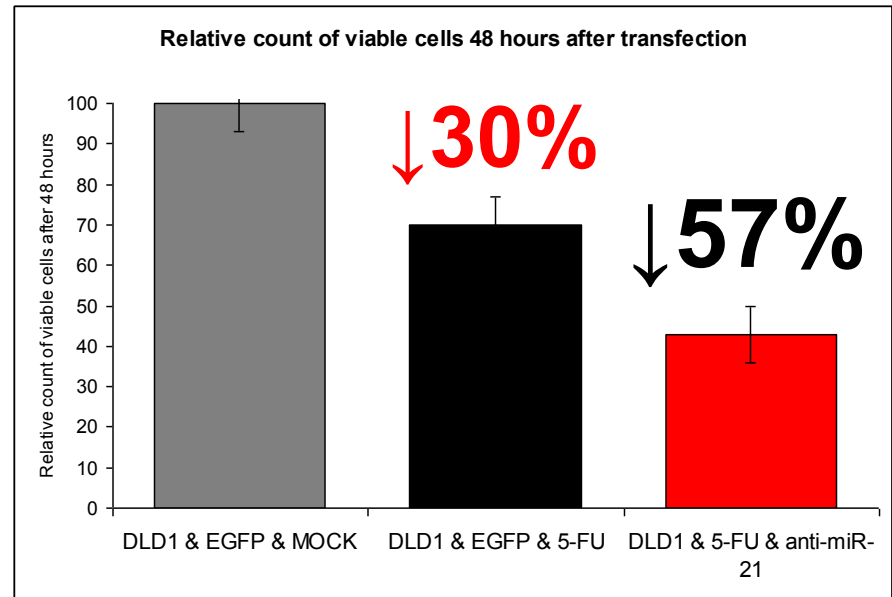
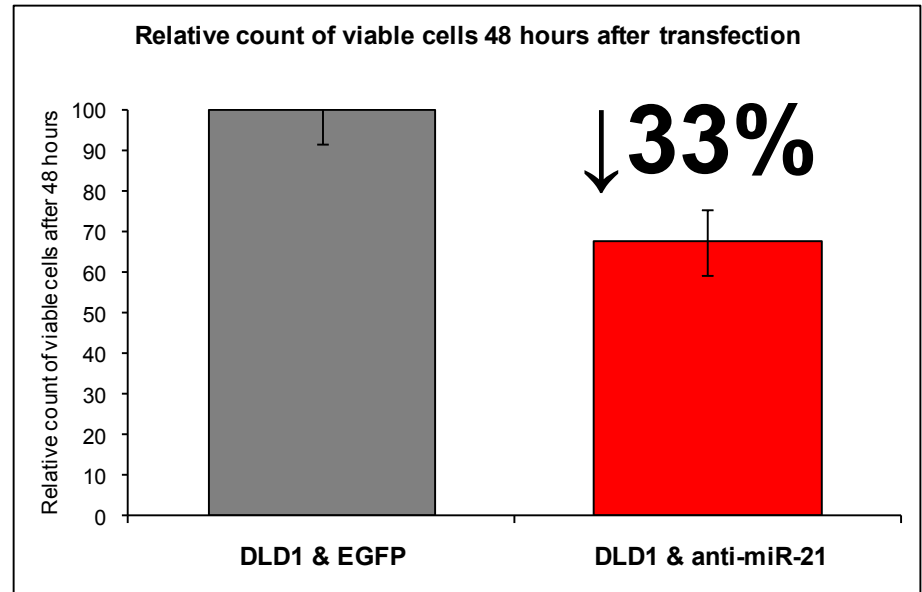
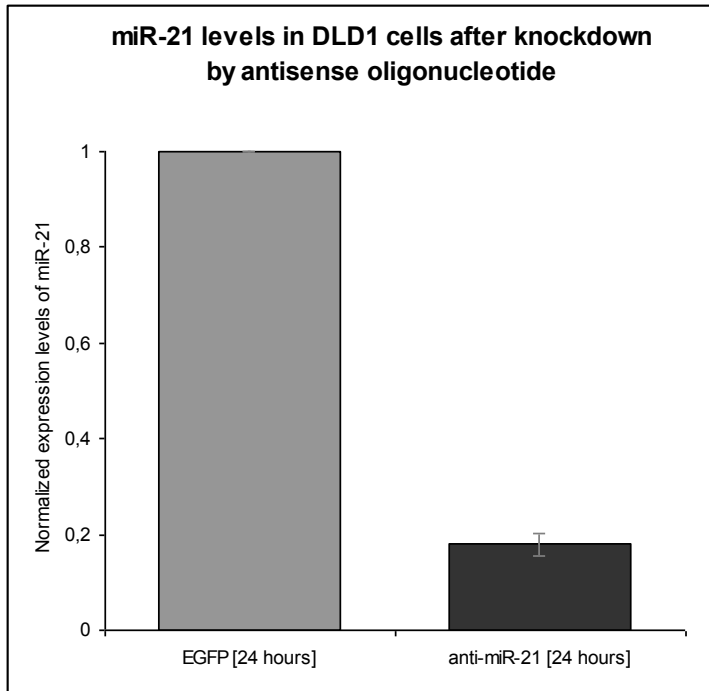
With chemotherapy by *miR-21* expression

High	16	13	7	5	2
Low	40	36	31	26	16

Without chemotherapy by *miR-21* expression

High	22	15	7	7	6
Low	41	37	26	20	14

Sensitizace DLD1 kolorektálního karcinomu k 5-FU transfekcí anti-miR-21



Comparison of miRNA expression profiles in CRC and matched non-tumoral tissue

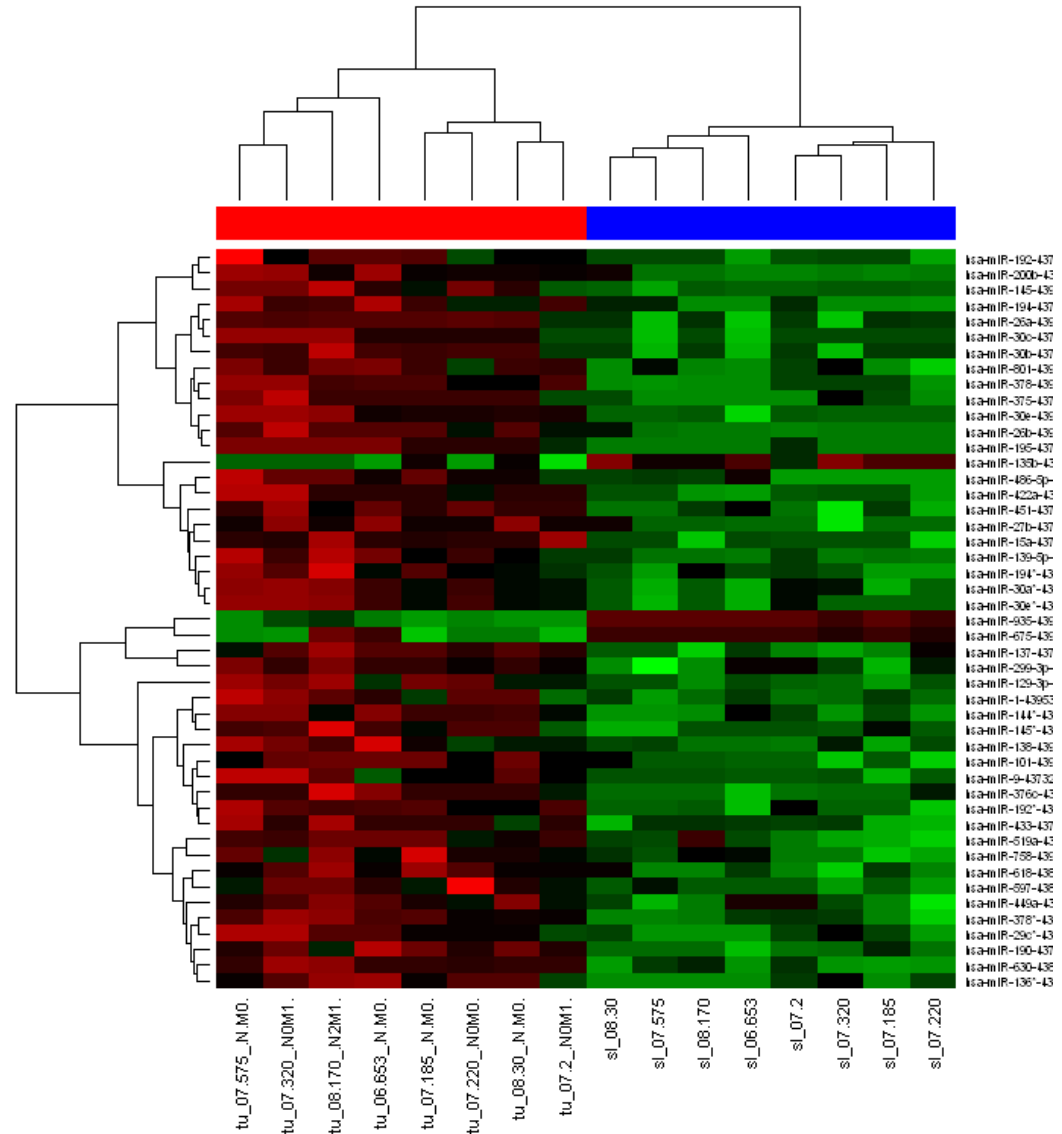
Applied Biosystems microRNA Real-Time PCR cards version 2.0 (667 microRNAs)

47 microRNAs according to paired LIMMA (p<0.001)

hsa-miR-935-4395289
hsa-miR-378-4395354
hsa-miR-195-4373105
hsa-miR-137-4373301
hsa-miR-378*-4373024
hsa-miR-422a-4395408
hsa-miR-190-4373110
hsa-miR-144*-4395259
hsa-miR-451-4373360
hsa-miR-630-4380970
hsa-miR-129-3p-4373297
hsa-miR-376c-4395233
hsa-miR-375-4373027
hsa-miR-26b-4395167
hsa-miR-192*-4395383
hsa-miR-139-5p-4395400
hsa-miR-801-4395183
hsa-miR-101-4395364
hsa-miR-519a-4395526
hsa-miR-618-4380996
hsa-miR-30e-4395334
hsa-miR-30e*-4373057
hsa-miR-145-4395389
hsa-miR-15a-4373123
hsa-miR-136*-4395211
hsa-miR-30a*-4373062
hsa-miR-135b-4395372
hsa-miR-299-3p-4373189
hsa-miR-1-4395333

...

by use of R, Bioconductor

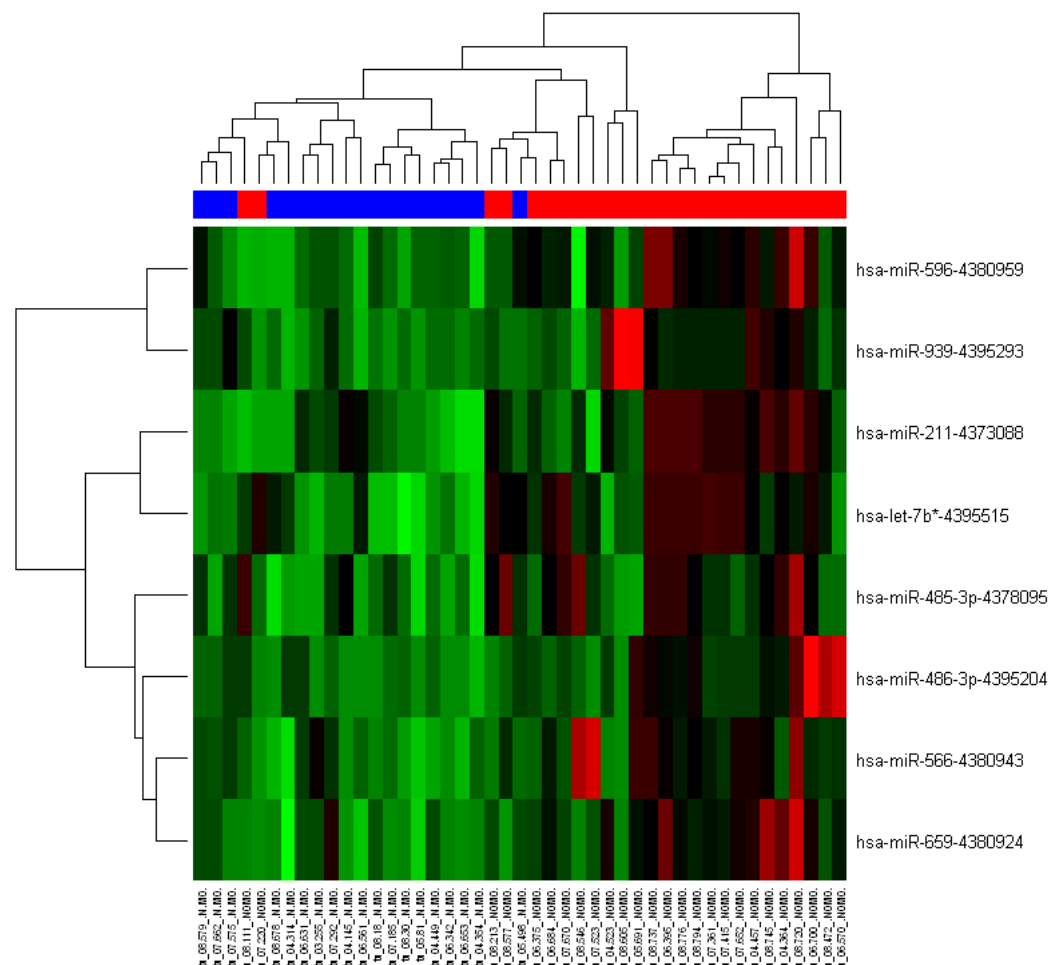


Detection of lymph nodes metastatic involvement from primary CRC tumor

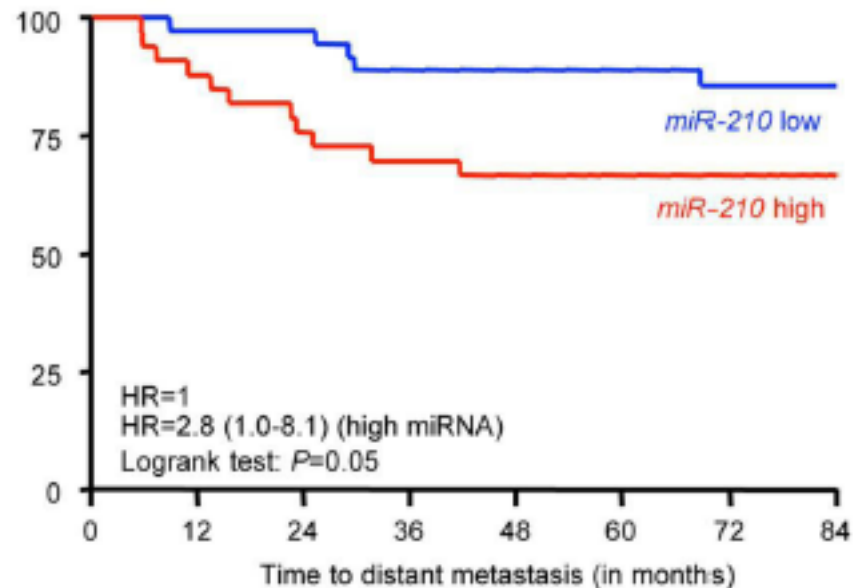
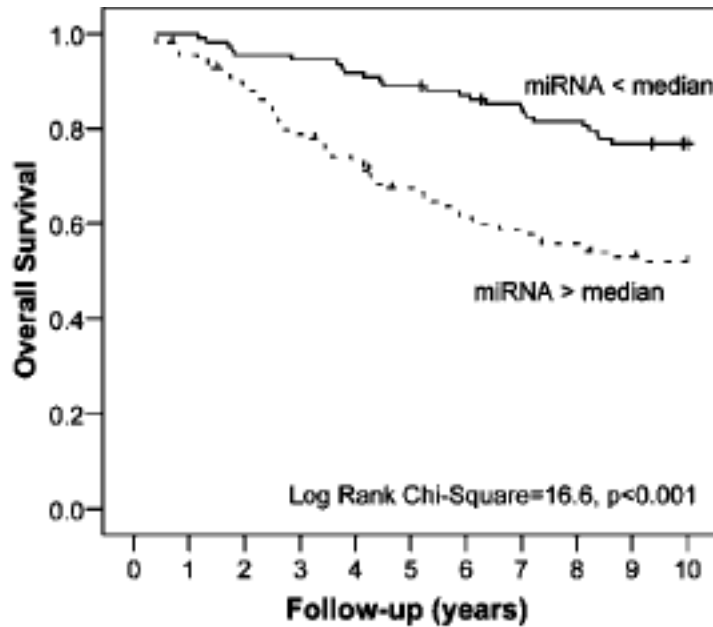
N+M0...blue (20 patients)
N0M0...res (25 patients)

According to LOOCV method
Sensitivity 79%
Specifity 81%
Balanced accuracy 80%

		aucv
hsa-let-7b*-4395515	N+M0	0.88664
hsa-miR-566-4380943	N+M0	0.82996
hsa-miR-485-3p-4378095	N+M0	0.822874
hsa-miR-659-4380924	N+M0	0.819838
hsa-miR-211-4373088	N+M0	0.818826
hsa-miR-486-3p-4395204	N+M0	0.814777
hsa-miR-596-4380959	N+M0	0.811741
hsa-miR-939-4395293	N+M0	0.811741



miR-210: prognostický marker u mamárního karcinomu



Camps et al, Clin Cancer Res, 2008

Foekens et al, PNAS, 2008

Iorio, Cancer Res 2006

**miR-210 transkripčně kontrolován HIF1alfa
zapojen do procesů indukovaných hypoxií**

miR-26a: prognostický a prediktivní marker hepatocelulárního karcinomu

D Survival According to miR-26a-1 Expression

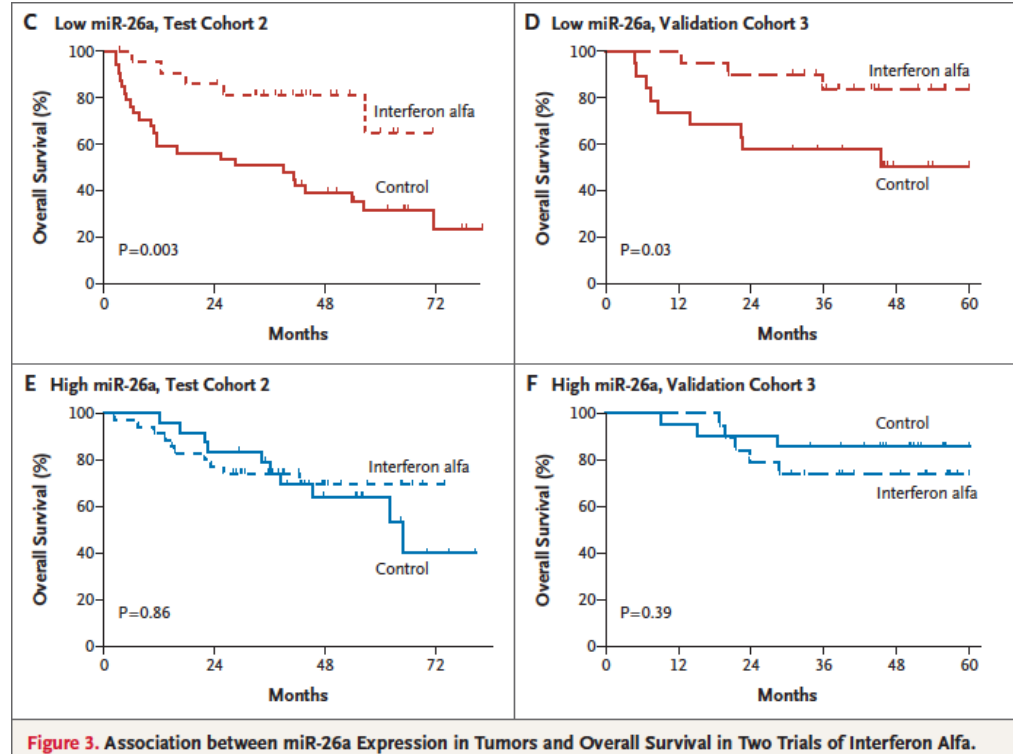
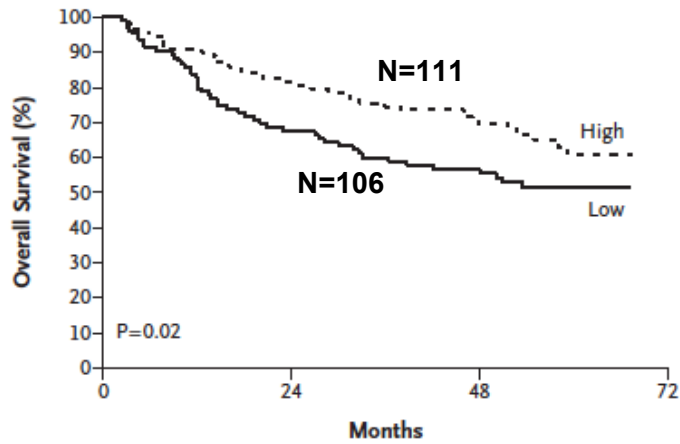


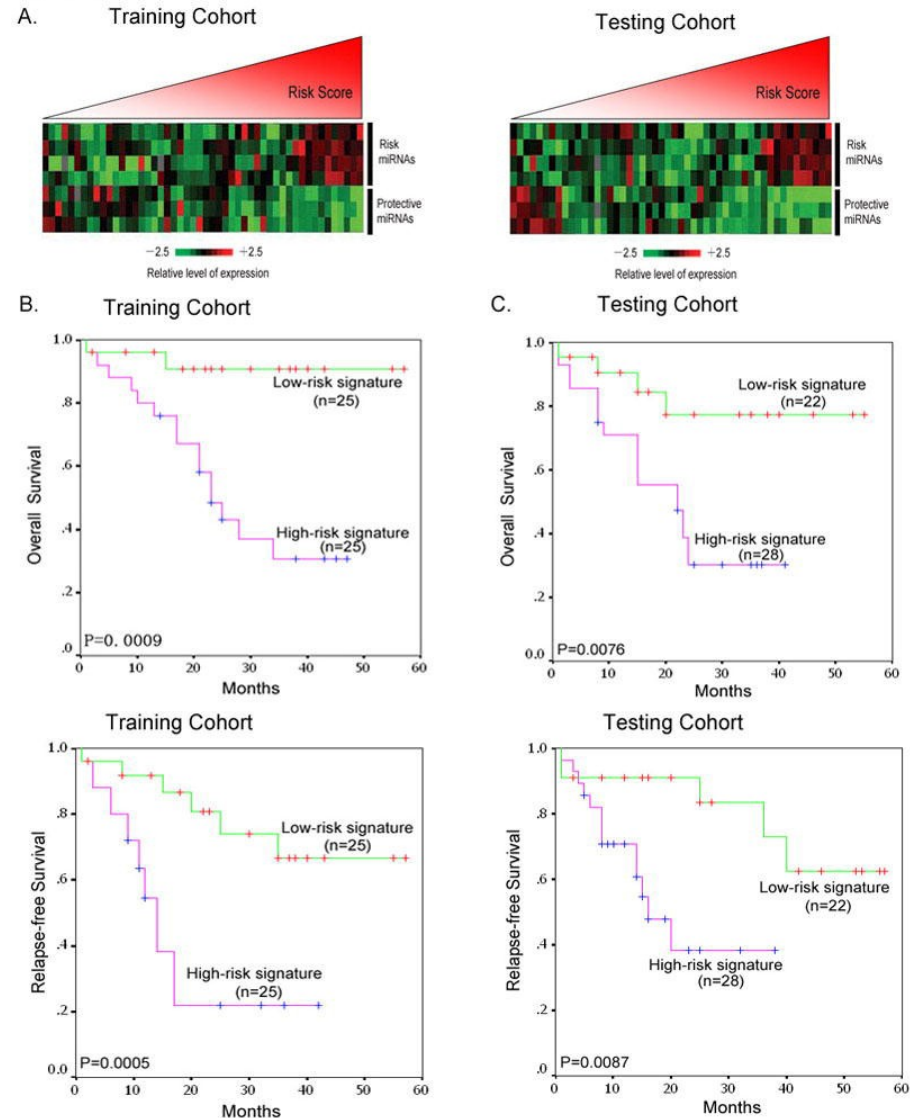
Figure 3. Association between miR-26a Expression in Tumors and Overall Survival in Two Trials of Interferon Alfa.

Junfang et al, NEJM, 2009

Predikce odpovědi na léčbu interferonem

mikroRNA: prognostická sada 7 mikroRNA u karcinomu žaludku

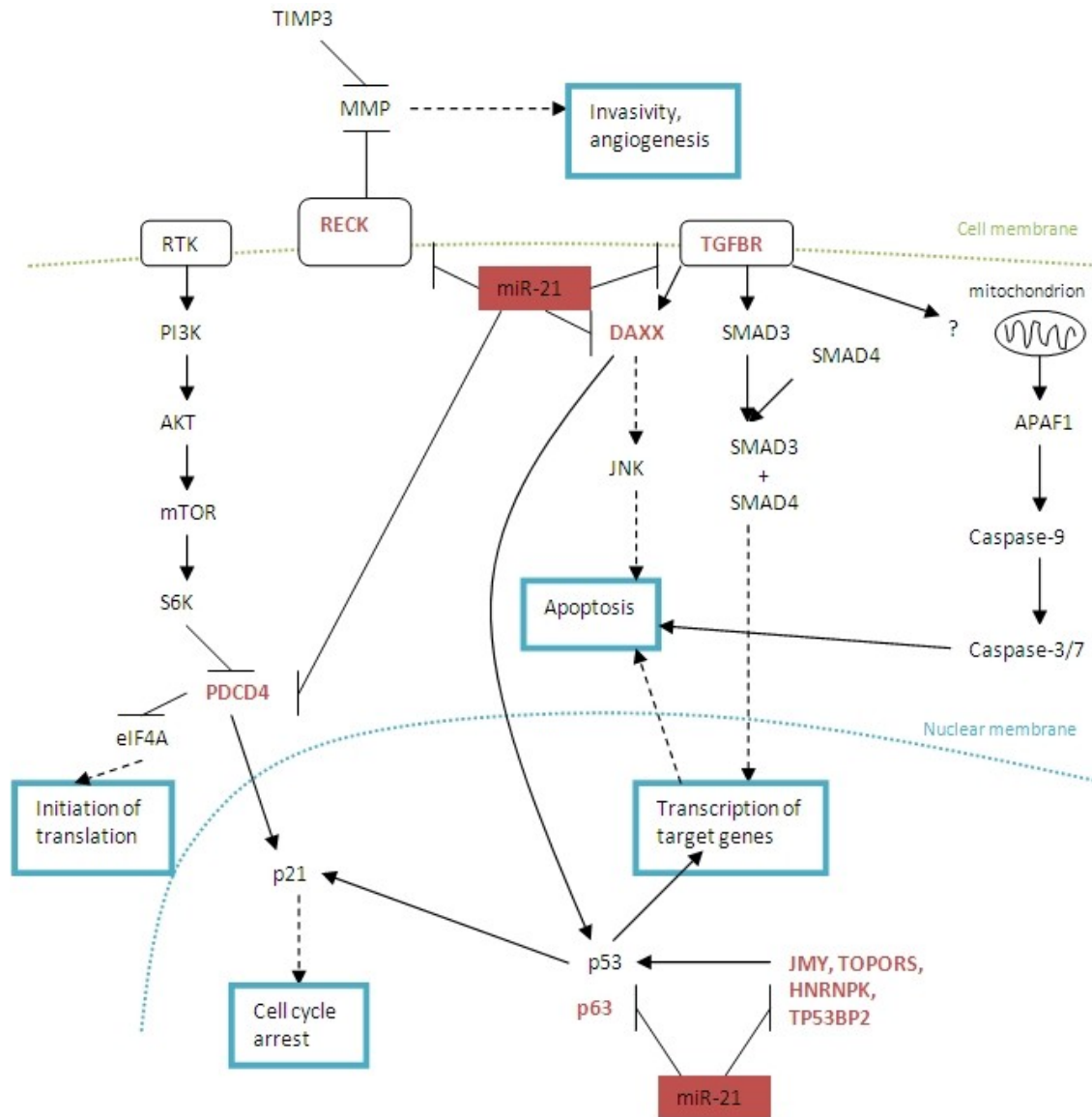
fig-1(lxh)



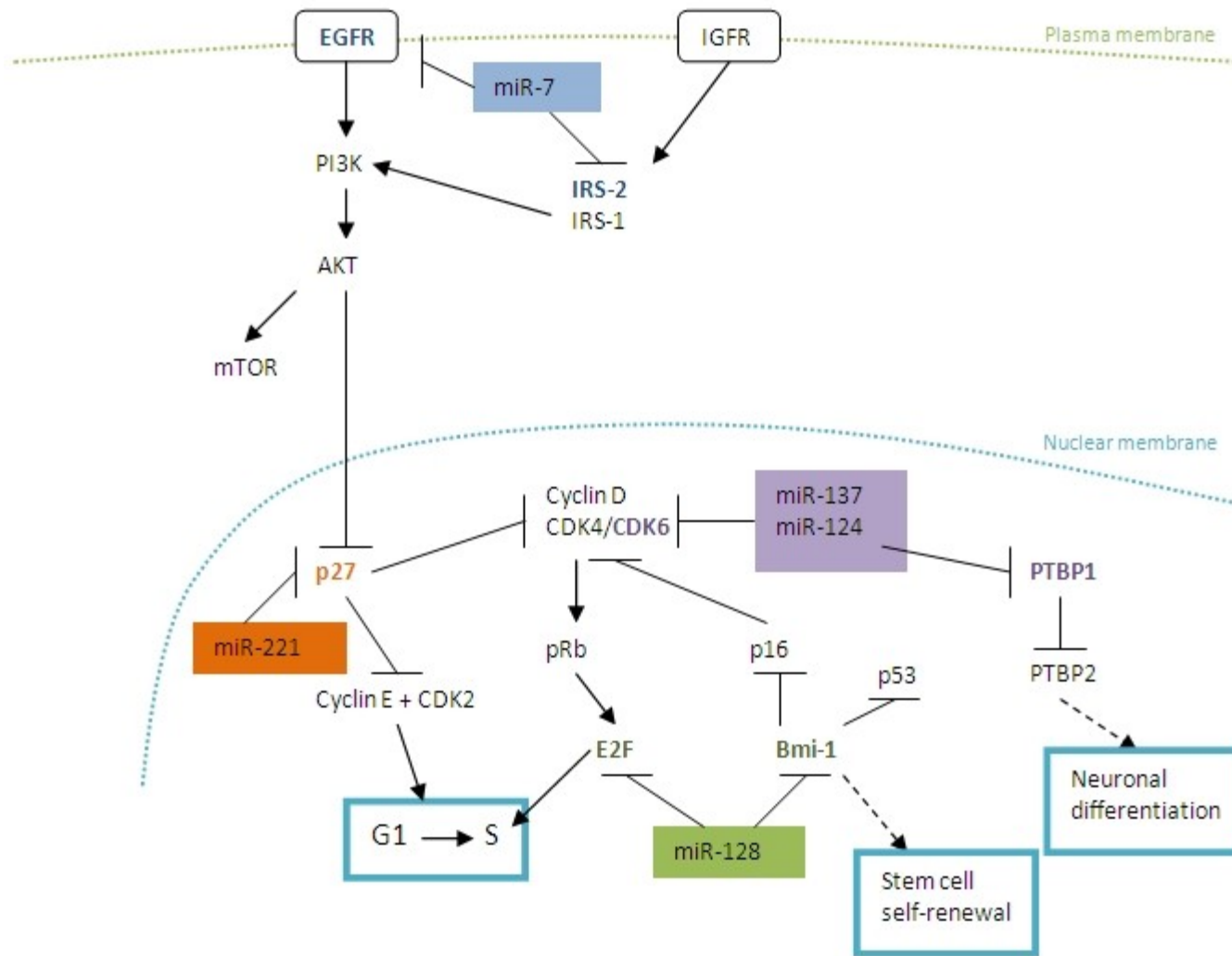
Xiaoh et al, Gut, 2010

miR-10b, miR-21, miR-223, miR-338, let-7a, miR-30a-5p, miR-126

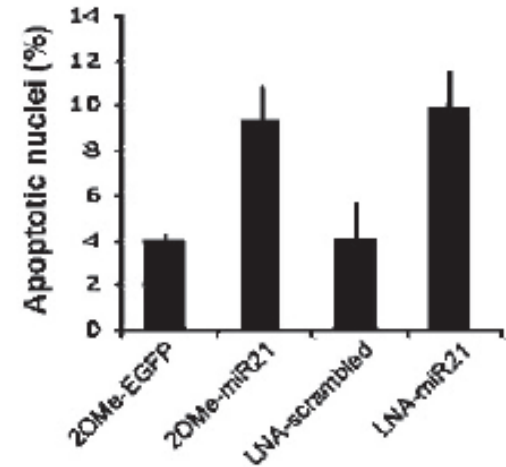
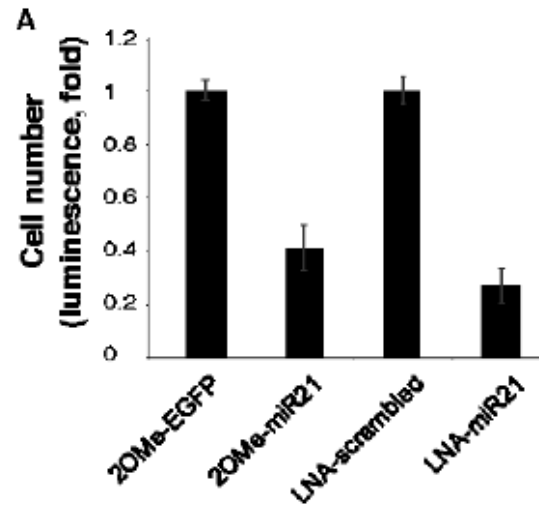
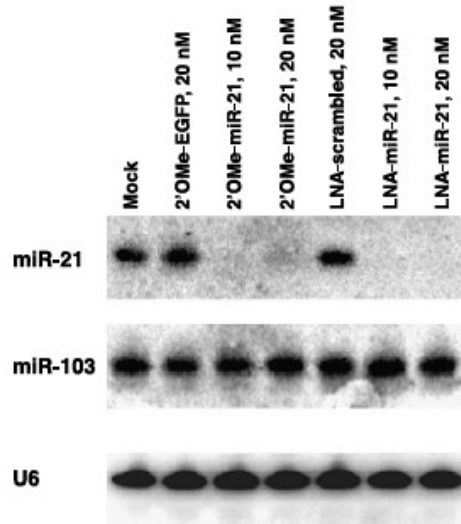
MikroRNA v patogenezi glioblastomu



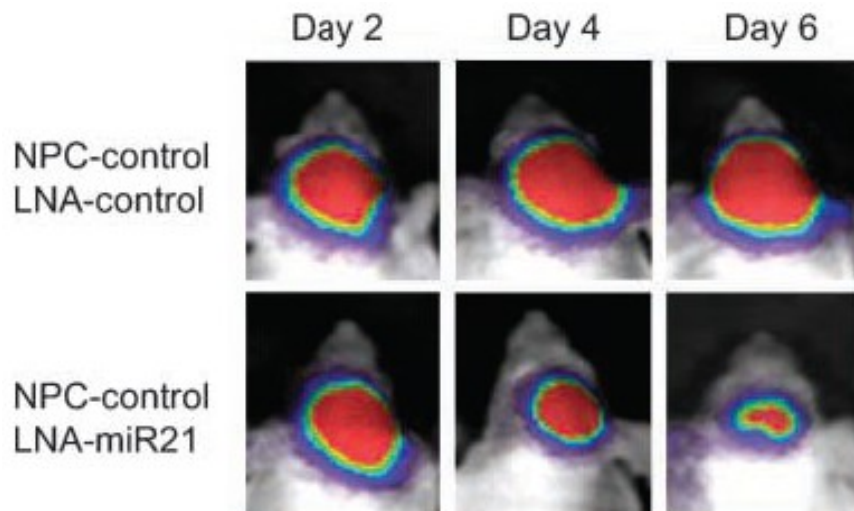
MikroRNA v patogenezi glioblastomu



MikroRNA ve výzkumu glioblastomu – mikroRNA-21



Chan et al, 2006

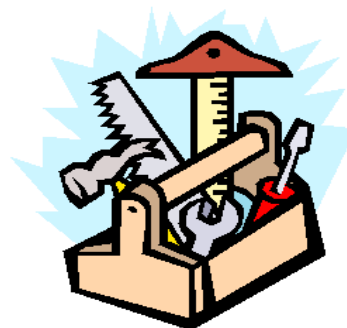
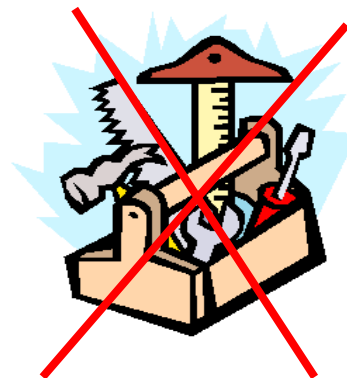
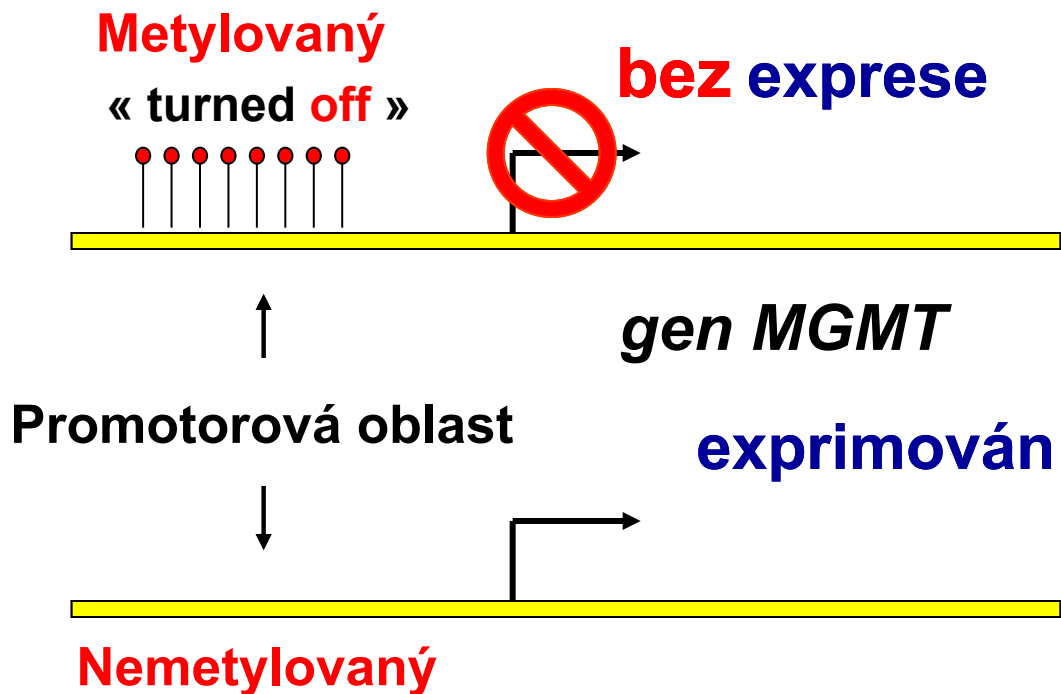


Corsten et al, 2007

Transientní transfekce anti-miR-21 vede k indukci apoptózy a snížení viability buněk v buněčné linii odvozené od GBM

Tento efekt detekovatelný také *in-vivo*

O⁶-metylguanin-DNA metyltransferáza (MGMT) v predikci odpovědi na léčbu temozolomidem (TMZ)

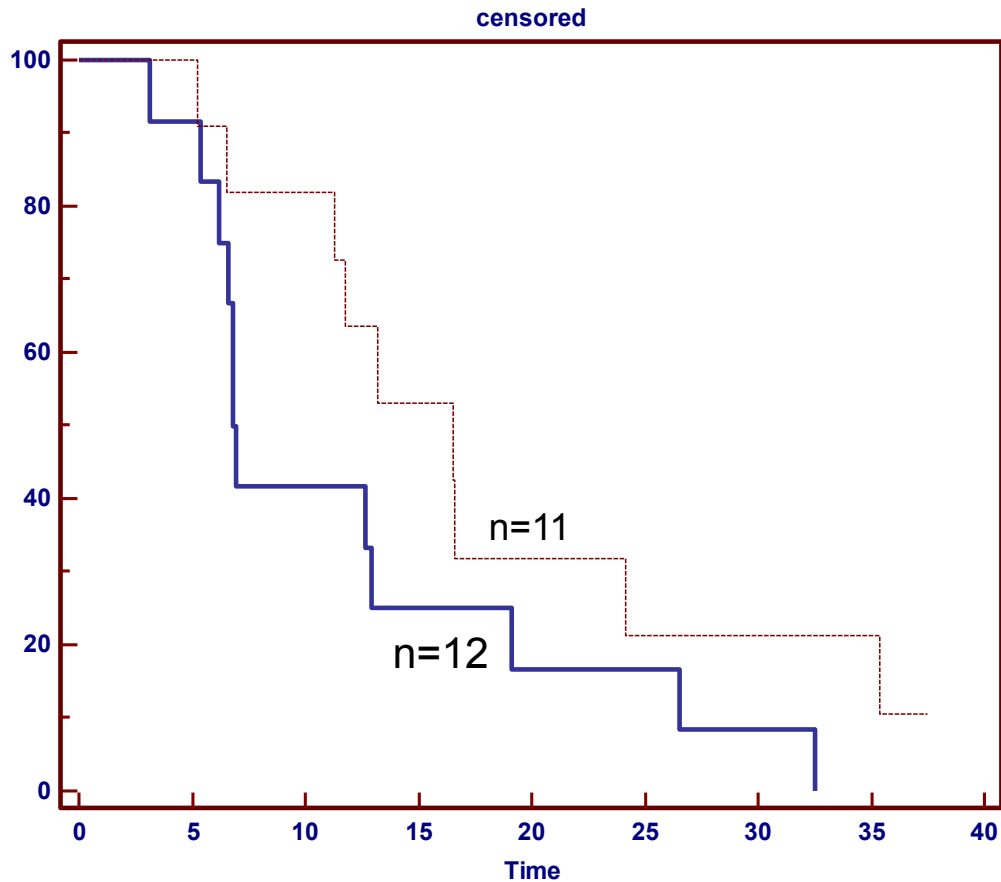


GBM s metylovaným promotorem MGMT

- **Není** reparační protein DNA - MGMT
- **Nejsou** opravována poškození DNA indukovaná účinkem temozolomidu
- Lepší odpověď na léčbu
- Lepší přežití pacientů s glioblastomem

Prediktivní význam vybraných mikroRNA u pacientů s multifórním glioblastomem – odpověď na nové alkylační agens temozolomid

Referenční metoda, stav metylace promotoru genu pro reparační protein MGMT stanovený metodou metylačně specifické Real-Time PCR (MSP)



Nemetylovaný promotor
Vyšší hladiny MGMT
Vyšší DNA reparační kapacita
- prognostický faktor

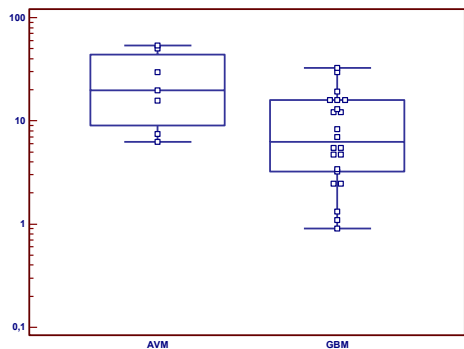
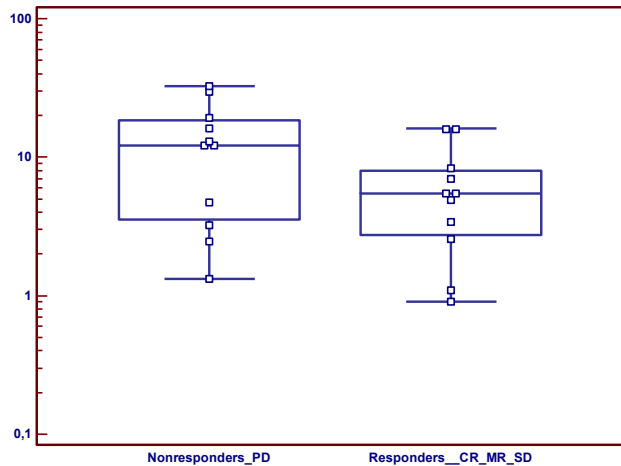


Metylovaný promotor
Nižší hladiny MGMT
+ prognostický faktor

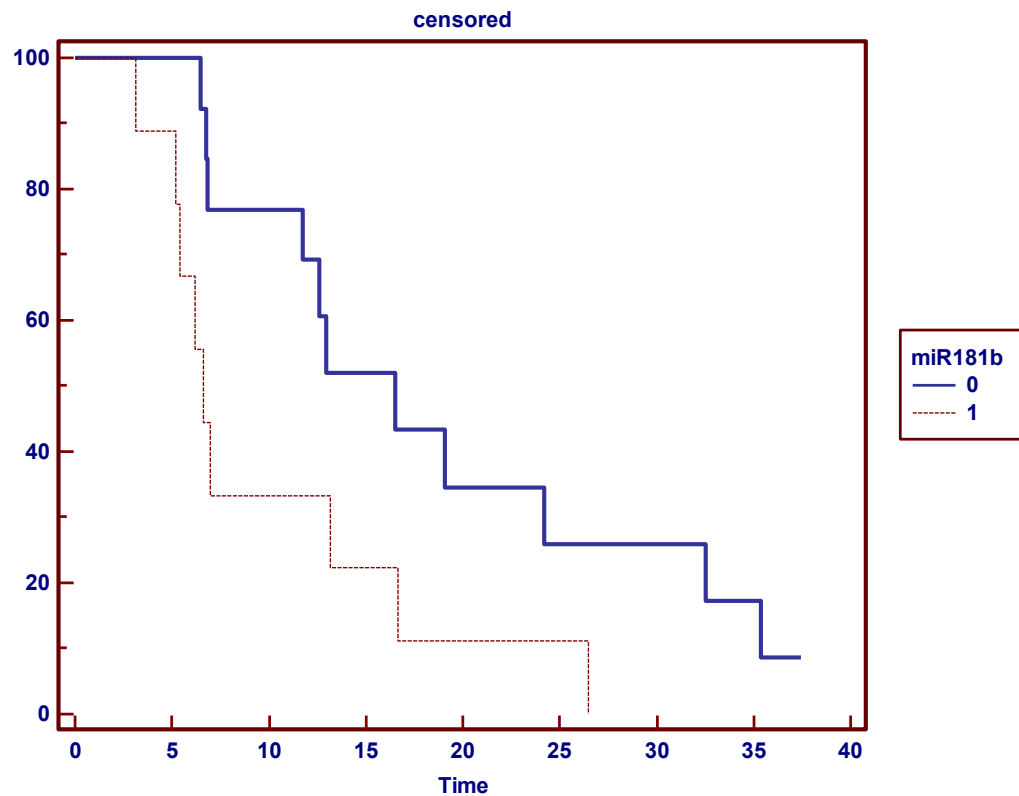
long-rank p=0,1455

Prediktivní význam vybraných mikroRNA u pacientů s multifornním glioblastomem – mikroRNA-181b

Vztah hladin miRNA-181b a radiologické odpovědi (MRI 1měsíc po terapii) na konkomitantní RT/TMZ ($p=0,036$, Mann-Whitney test)



Vliv hladin miR-181b na OS pacientů s glioblastomem (long-rank $p=0,0409$)



Srovnání hladin miR-181b v AVM a GBM ($p=0,0181$).

Slaby et al., Neoplasma, 2009.



RESEARCH

Open Access

Expression of miRNA-106b in conventional renal cell carcinoma is a potential marker for prediction of early metastasis after nephrectomy

Ondrej Slaby^{*1,3}, Jana Jancovicova⁴, Radek Lakomy¹, Marek Svoboda¹, Alexandr Poprach¹, Pavel Fabian², Leos Kren⁵, Jaroslav Michalek³ and Rostislav Vyzula¹

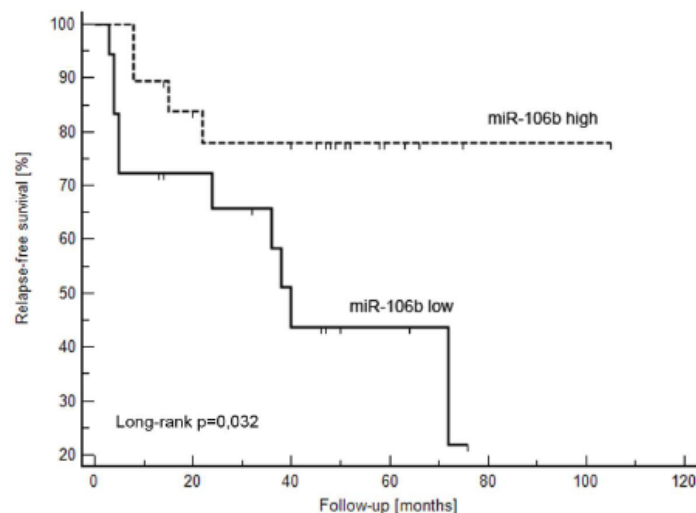
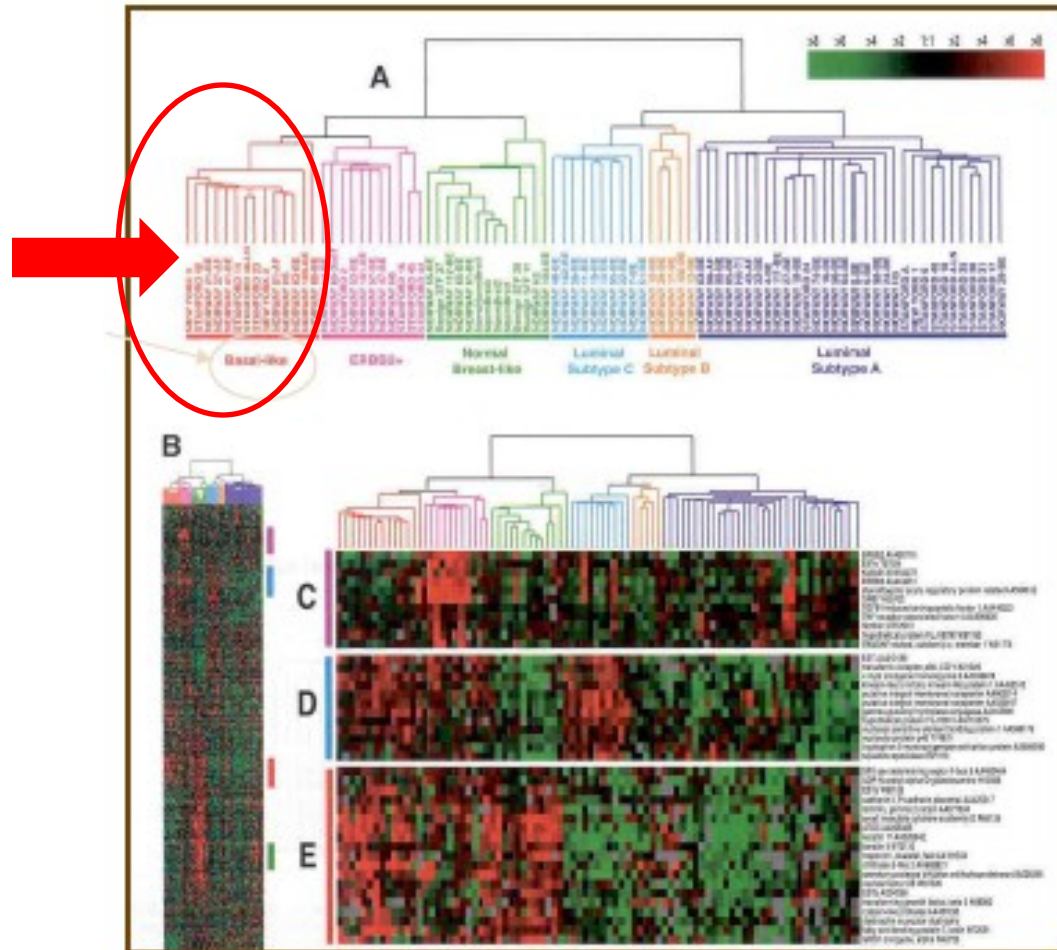


Figure 4 Relapse-free survival of patients with RCC based on the miR-106b expression levels (cutoff = median of miR-106b expression).

Molekulární klasifikace karcinomu prsu

**Basal-like
karcinom
prsu**



Triple Negative (ER-, PR-, HER2-)

Zvýšená proliferace ($P < 0.0001$)

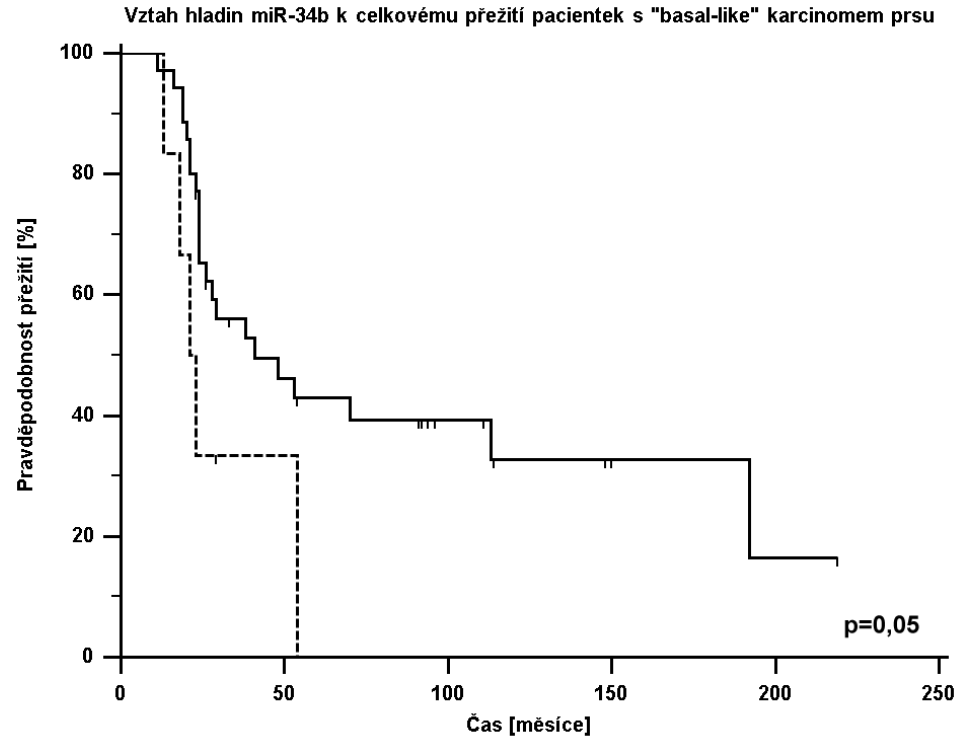
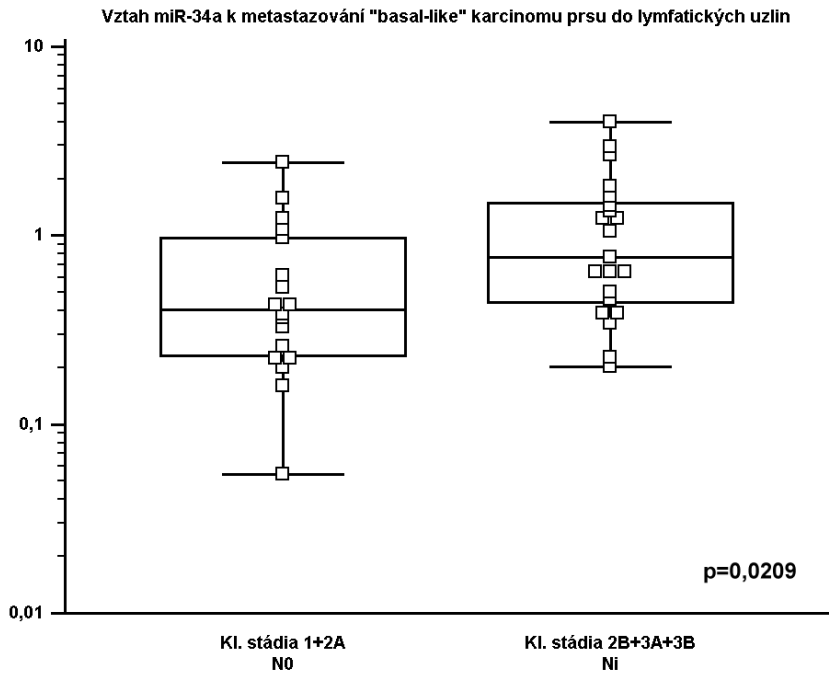
Nízká diferenciace ($P < 0.003$)

Výsoký grade ($P < 0.0001$)

Mutace v TP53 ($P < 0.001$)

Význam rodiny mikroRNA-34a-c u „basal-like“ mamárního karcinomu

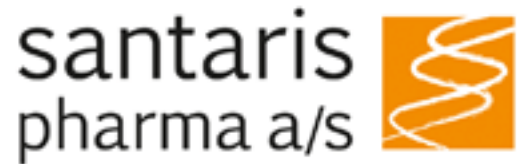
miR-34a je signifikantně zvýšená u pacientek s „basal-like“ karcinomy metastazujícími do uzlin.
miR-34b je silný negativní prognostický faktor.





miRview™ mets: Unsolving the Mystery of Cancer of Unknown Primary (CUP)

Identifying the primary origin of a metastasis



RNA Medicines for the 21st Century

Santaris Pharma begins human clinical testing of world's first microRNA *SPC3649 (LNA-antimiR-122)* being developed as a potential new therapy for *Hepatitis C virus (HCV)* infection

May 28, 2008 – Santaris Pharma, the Danish biopharmaceutical

Děkuji Vám za pozornost

Poděkování

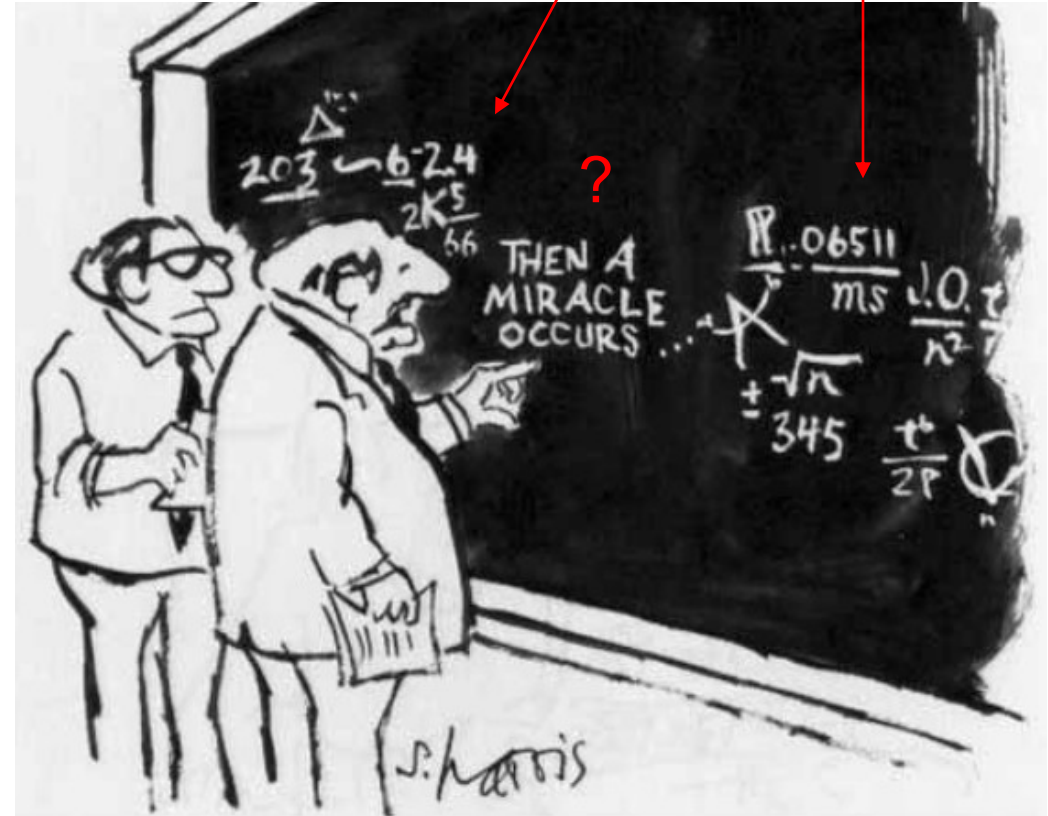
Masarykův onkologický ústav
prof. MUDr. Rostislav Vyzula, Ph.D.
MUDr. Marek Svoboda, Ph.D.
MUDr. Pavel Fabian, Ph.D.
MUDr. Rudolf Nenutil, Ph.D.
MUDr. Milana Šachlová, Ph.D.
MUDr. Radek Lakomý
MUDr. Eva Lžičařová
Mgr. Roman Hrstka, Ph.D.

FN Brno
Neurochirurgická klinika
MUDr. Pavel Fadrus, Ph.D.
prof. MUDr. Martin Smrčka, Ph.D.
Ústav patologie
MUDr. Leoš Křen, Ph.D.

Univerzitní centrum
buněčné imunoterapie
prof. MUDr. Jaroslav Michálek, Ph.D.

deregulace hladin miRNA

klinická pozorování



"I think you should be more explicit here in step two."

